



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Medicina Veterinaria

Unidad de Posgrado

“Detección del *Staphylococcus schleiferi* subespecie *coagulans* en perros con otitis externas provenientes de la Clínica de Animales Menores de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos”

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Ciencias Veterinarias con mención en Medicina y Cirugía Animal

AUTOR

Joel André PALOMINO FARFÁN

ASESOR

Sonia Yenny CALLE ESPINOZA DE CAMACHO

Lima, Perú

2019



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Palomino J. Detección del *Staphylococcus schleiferi* subespecie *coagulans* en perros con otitis externas provenientes de la Clínica de Animales Menores de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Unidad de Posgrado; 2019.

Hoja de metadatos complementarios

- **Código ORCID del autor:** orcid.org/0000-0001-8477-0421
- **Código ORCID del asesor:** orcid.org/0000-0003-4955-2378
- **DNI o pasaporte del autor:** 46238101
- **Grupo de investigación:** Microbiología Aplicada a la Salud Pública-Animal y de Impacto Ambiental (MASPAIA)
- **Institución que financia la investigación:**
 - Vicerrectorado de Investigación y Posgrado
- **Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación:**
 - Av. Circunvalación 2800, San Borja, Lima – Perú (-12.080729, -76.987032)
- **Año o rango de años que la investigación abarcó:** 2018



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
Facultad de Medicina Veterinaria



UNIDAD DE POSGRADO

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE
MAGÍSTER EN CIENCIAS VETERINARIAS CON MENCIÓN EN MEDICINA Y
CIRUGÍA ANIMAL

En el Auditorio de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, siendo las 14:00 horas del día lunes 09 de diciembre de 2019, el Jurado Examinador de Tesis de Grado de Magíster, presidido por el Mg. Roberto César Dávila Fernández (**presidente**) y constituido por los siguientes miembros: Mg. Sonia Yenny Calle Espinoza (**Asesora**), Mg. Clarisa Elizabeth Hinostroza Meza, Dr. Juan More Bayona, se dio inicio a la sustentación oral y pública de la Tesis intitulada:

“Detección del *Staphylococcus schleiferi* subespecie *coagulans* en perros con otitis externas provenientes de la Clínica de Animales Menores de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos”, presentado por el Bachiller:

JOEL ANDRÉ PALOMINO FARFÁN

Quien sustentó la Tesis para obtener el Grado Académico de Magíster en Ciencias Veterinarias con mención en Medicina y Cirugía Animal y absolvió satisfactoriamente las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado y practicada la votación obtuvo la calificación de: **DIECISIETE (17) MUY BUENO** _____

A continuación, el Presidente del Jurado recomendó a la Unidad de Posgrado de la Facultad de Medicina Veterinaria, proponga el otorgamiento del **Grado Académico de Magíster en Ciencias Veterinarias con mención en Medicina y Cirugía Animal**, al Bachiller: **Joel André Palomino Farfán**.

Siendo las 15:30 horas del día 09 de diciembre de 2019, se dio por concluido el acto académico, suscribiéndose la presente Acta.

.....
Mg. Roberto Dávila Fernández (P.Asoc. T.P.)
Presidente

.....
Mg. Sonia Yenny Calle Espinoza (P. P. D.E)
Miembro (Asesora)

.....
Mg. Clarisa Elizabeth Hinostroza Meza
Miembro Externo

.....
Dr. Juan Anderson More Bayona
Miembro Externo

.....
Dr. César Miguel Gavidia Chucán (P.P.D.E)
Director de la Unidad de Posgrado
Facultad de Medicina Veterinaria
UNMSM



*Dedicado a todos los que perseveran,
a quienes no se rinden a pesar de la adversidad,
a quienes luchan cada día por ser mejores.*

Agradezco a Dios, por darme siempre la oportunidad de ser mejor cada día.

A mi mamá Julia. Cada logro en mi vida es reflejo de la buena madre que ha sido siempre, por mostrarme que todo es posible con dedicación y esfuerzo.

A mi abuelita Mami, que desde el cielo me sigue cuidando, acompañada de todas las mascotas que con tanto amor cuidó.

A mi familia y amigos que me dieron aliento cuando más lo necesité y depositaron su confianza en mí para lograr superar cada desafío.

Al gran equipo del Laboratorio de Bacteriología. Gracias por todo su apoyo y buenos consejos. Bendecido de formar parte de un grupo de excelentes profesionales y maravillosas personas.

ÍNDICE

RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE CUADRO	ix
LISTA DE FIGURAS	x
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Oído y canal auditivo canino	3
2.1.1. Otitis externa	3
2.2. Género <i>Staphylococcus</i> sp.	4
2.2.1. <i>Staphylococcus schleiferi</i>	5
2.2.2. <i>Staphylococcus schleiferi</i> subespecie <i>coagulans</i>	5
2.2.3. Etiología	6
2.2.4. Importancia en la Salud Pública	6
2.2.5. Pruebas de identificación	7
2.2.5.1. Pruebas bioquímicas	7
2.2.5.2. Método de reacción en cadena a la polimerasa (PCR)	9
2.3. Resistencia bacteriana	9
2.3.1. Factores de virulencia	9
2.3.2. Sensibilidad a los antimicrobianos	10
III. MATERIALES Y MÉTODOS	12
3.1. Diseño del estudio	12
3.2. Lugar de ejecución y periodo de duración	12
3.3. Descripción y tamaño de muestra	12
3.4. Materiales, equipos, reactivos y medios de cultivo	13
3.5. Identificación de las muestras	13

3.6.	Procesamiento de las muestras	14
3.6.1.	Toma de muestra	14
3.6.2.	Aislamiento bacteriológico	14
3.6.3.	Identificación preliminar	14
3.6.4.	Pruebas bioquímicas	14
3.6.5.	Identificación molecular del <i>S. schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i>	16
3.6.6.	Purificación y secuenciación de los amplificadores del ARN	18
3.6.7.	Prueba de sensibilidad antimicrobiana	18
IV.	RESULTADOS	20
4.1	Aislamiento de <i>Staphylococcus</i> sp.	20
4.2	Identificación bioquímica del <i>Staphylococcus</i> sp.	20
4.3	Identificación molecular del <i>S. schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i>	24
4.3.1	Extracción de ADN	24
4.3.2	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	25
4.4	Purificación y secuenciación	27
4.5	Sensibilidad antimicrobiana	27
V.	DISCUSIONES	31
VI.	CONCLUSIONES	37
VII.	RECOMENDACIONES	38
VIII.	LITERATURA CITADA	39
IX.	APÉNDICE	46

RESUMEN

Las otitis externas son parte de los casos más recurrentes en la clínica diaria de animales de compañía. Desde su descubrimiento en 1990, el *Staphylococcus schleiferi* subespecie *coagulans* viene siendo reportada con mayor frecuencia en las piodermias y otitis externas caninas, e inclusive, en casos de zoonosis. Por ello, el objetivo principal de esta investigación fue detectar la presencia del *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* de otitis externas caninas provenientes de la Clínica de Animales Menores de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (CAME FMV UNMSM). Para ello se evaluaron un total de 148 muestras de hisopados óticos, siendo 112 positivas a *Staphylococcus* sp. y la identificación fue realizada mediante pruebas bioquímicas convencionales (coagulasa, producción de acetoina, y fermentación de trehalosa y manitol) y análisis molecular por PCR. 34/112 (30,36%) aislados fueron identificadas como *S. schleiferi* subsp. *coagulans*. La susceptibilidad a los antimicrobianos mostró que la ciprofloxacina, el antibiótico más popular utilizado para la otitis externa, obtuvo el nivel de resistencia del 20.6% (7/34), mientras que la nitrofurantoína fue el antibiótico más efectivo contra esta bacteria (97.1%). Además, el 40% (13/34) de los aislados de *S. schleiferi* subsp. *coagulans* fueron resistentes a la meticilina. Este estudio es el primer reporte de *Staphylococcus schleiferi* subespecie *coagulans* en el Perú, hallando un porcentaje mayor al reportado en otros países sudamericanos.

Palabras clave: Otitis externa, perros, *Staphylococcus schleiferi* subespecie *coagulans*, PCR.

ABSTRACT

External otitis are part of the most recurrent cases in the daily clinical practice of companion animals. Since its discovery in 1990, *Staphylococcus schleiferi* subspecies *coagulans* has been reported more frequently in canine pyoderma and otitis externa, and even in cases of zoonoses. Therefore, the purpose of this investigation was to detect the presence of *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* of canine otitis externa from the Clinic of Small Animal of the Faculty of Veterinary Medicine of National University of San Marcos. One-hundred-forty-eight samples of ear swabs were evaluated, obtaining 112 isolates positives to *Staphylococcus* spp. The identification was performed by conventional biochemical tests (coagulase, acetoin production, and acid production from trehalose and mannitol) and molecular analyze by PCR. Thirty-four (30,34%) isolates were identified as *Staphylococcus schleiferi* subspecies *coagulans*. Antimicrobial susceptibility showed that ciprofloxacin, the most popular antibiotic used for otitis externa, obtained a resistance level of 20.6% (7/34), while nitrofurantoin was the most effective antibiotic against this bacteria (97.1%). Furthermore, 40% (13/34) of the isolates of *S. schleiferi* subsp. *coagulans* were methicillin-resistant. This study is the first report of *S. schleiferi* subsp. *coagulans* in Peru, finding a higher percentage than reported in other South American countries.

Key words: External otitis, dogs, *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans*, PCR.

LISTA DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1: Características diferenciales entre las especies del género <i>Staphylococcus</i> .	8
Cuadro 2: Rangos de sensibilidad antimicrobiana de acuerdo a cada antibiótico. Puntos de corte establecidos por el Instituto de Estándares Clínicos y Laboratoriales (CLSI).	19
Cuadro 3: Resultados generales de las pruebas bioquímicas realizadas a los 112 aislados.	21
Cuadro 4: Lista de aislados positivos a <i>S. schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i> .	26
Cuadro 5: Resultados de las pruebas bioquímicas de las 34 cepas positivas a <i>S. schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i> .	26
Cuadro 6: Sensibilidad antimicrobiana de <i>S. schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i> .	28

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Género <i>Staphylococcus</i> sp. visualizado a través de un microscopio electrónico.	5
Figura 2: Gráfica de las concentraciones de ADN analizadas por espectrofotometría.	24
Figura 3: Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Carriles: M, marcador de peso molecular 1.5Kb; 1, muestra en blanco (agua ultra pura); 2, aislado S027 con la banda en la región 1369pb; 3, aislado S058 con la banda en la región 1369pb; carril 4, cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 4330); carril 5: <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> (cepa perteneciente al Laboratorio de Microbiología y Parasitología – Sección Bacteriología y Micología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos).	25
Figura 4: Frecuencias de la sensibilidad antimicrobiana de acuerdo a cada antibiótico probado. Puntos de corte establecidos por el CLSI.	29
Figura 5: Número de resistencias antimicrobianas que presentan los 34 aislados de <i>S. schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i> .	30

I. INTRODUCCIÓN

Las otitis externas son uno de los motivos de consulta más comunes en la clínica diaria de caninos. Las razas de perros con mayor predisposición a esta enfermedad son los shar-peis, bulldogs, bull terriers, cocker spaniels y pastores alemanes (Nuttall y Cole 2004; Zur *et al.* 2011). Otros factores predisponentes son reacciones alérgicas, cuerpos extraños, neoplasias, desórdenes autoinmunes, o perros atópicos (Korbelik *et al.* 2019).

La microbiota ótica de los perros está compuesta por bacterias, hongos y parásitos, que cumplen el rol de proteger la superficie ótica de otros microorganismos medio ambientales. El desconocimiento de esta función al usar soluciones antisépticas como limpiadores permite el ingreso y colonización de otros microorganismos patógenos (Nuttall y Cole 2004; Ngo *et al.* 2018). Muchas veces se opta por un tratamiento empírico con soluciones locales e incluso, acompañados de una terapia sistémica (Wiebe 2015).

Realizar tratamientos sin conocer el problema primario ni el agente microbiano causal genera no sólo un retraso en la recuperación del paciente, sino que además puede producir una multirresistencia bacteriana u ocasionar daños más severos en el perro como ruptura del tímpano y por consiguiente un trastorno del equilibrio (Newman *et al.* 2015).

Los estafilococos son las bacterias predominantes en las otitis externas en perros. Los *Staphylococcus* coagulasa positivos (CoPS) han mostrado ser clínicamente más agresivos y de compartir genes de resistencia a los antimicrobianos (Devriese *et al.* 2005; Griffeth *et al.* 2008; Sasaki *et al.* 2010).

El *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* es comúnmente confundido con otros CoPS por sus características morfológicas y bioquímicas similares (Devriese *et al.* 2005). De esta forma, su identificación e importancia epidemiológica se ve sesgada.

Así mismo, la propia diferenciación entre las subespecies de *Staphylococcus schleiferi* es compleja debido a que poseen polimorfismos de longitud iguales y sólo realizar un PCR no basta, esto debe complementarse con otras pruebas bioquímicas (Yamashita *et al.* 2005).

Desde su descubrimiento en 1990, los casos de aislamiento de *S. schleiferi* subsp. *coagulans* han ido aumentando y en varios estudios se menciona la gran similitud que existe con otras bacterias del mismo género, dejando en duda que tal vez existan más casos que son diagnosticados erróneamente como otra bacteria.

Se han reportado cepas de *S. schleiferi* subsp. *coagulans* resistentes a la Meticilina (Kania *et al.* 2004; Bemis *et al.* 2006; Kumar *et al.* 2007; Griffeth *et al.* 2008; Kawakami *et al.* 2010; Davis *et al.* 2013; Swe *et al.* 2016) y a fluoroquinolonas (Muñoz *et al.* 2012; Davis *et al.* 2013).

Adicionalmente, hasta la fecha se han reportado 4 casos en humanos de *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* (Vandenesch *et al.* 1994; Kumar *et al.* 2007; Thibodeau *et al.* 2012; Swe *et al.* 2016), sobre todo en uno de los casos donde se sospechó el contagio por un perro con otitis y piodermias recurrentes (Kumar *et al.* 2007).

En nuestro país no se ha realizado ningún estudio de identificación bacteriana que pueda confirmar la presencia del *S. schleiferi* en humanos ni en animales. Por ello, el objetivo del presente estudio fue detectar la presencia del *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* de otitis externas caninas mediante pruebas bioquímicas convencionales y diagnóstico molecular, junto con una evaluación de susceptibilidad antimicrobiana.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Oído y canal auditivo canino

La forma y tamaño de las orejas de los perros puede variar dependiendo de la raza, pero el oído se distribuye de igual manera para todos en conducto externo, medio e interno (Wisner y Zwingenberger 2015). El oído secreta continuamente cerumen como mecanismo de limpieza y protección ante agentes externos. El cerumen está compuesto por células exfoliadas, aceites, ácidos libres de grasas, esteroides, inmunoglobulinas y proteínas (Nuttall y Cole 2004). Se ha descrito que en la microbiota ótica puede encontrarse varios tipos de bacterias, siendo el *Staphylococcus pseudintermedius* el más común, o levaduras como la *Malassezia pachydermatis* (Coatesworth 2011; Ngo *et al.* 2018; Korbely *et al.* 2019). La estabilidad de la microbiota ótica puede conocerse realizando citologías, donde el número máximo de bacterias y de levaduras a observar debe ser como máximo de 5 por campo visual (100x) (Craig 2013; Choi *et al.* 2018).

Las razas de perros que presentan cambios anatómicos del canal de las orejas a causa de la selección genética, tienen un índice mayor de predisposición a tener otitis externa. Entre las razas figuran los shar-peis, bulldogs, bull terriers, cocker spaniels, pastores alemanes, poodles, bichones frises, entre otros (Nuttall y Cole 2004; Zur *et al.* 2011).

2.1.1. Otitis externa

La otitis es el resultado crónico de una inflamación causando exudados ceruminosos y acuosos (Wisner y Zwingenberger 2015; Rhodes y Werner 2018). La otitis externa canina es una de las enfermedades más comunes en la práctica diaria, presentándose entre un 5 a 20%

de los perros (Penna *et al.* 2010; Coatesworth 2011; Korbelik *et al.* 2019). Y de los casos de otitis externa, más del 80% están relacionados a cuadros de dermatitis alérgica (Zur *et al.* 2011; Wiebe 2015).

Entre los factores predisponentes más comunes que pueden conllevar a una otitis externa están traumatismo, parasitosis (*Otodectes cynotis*, *Otobius megnini*, y *Demodex*), hipersensibilidad, cuerpos extraños, enfermedad autoinmune (dermatitis atópica), hipotiroidismo, celulitis juvenil, y desórdenes de queratinización (Coatesworth 2011; Bugden 2013; Wiebe 2015). Bacterias como el *Staphylococcus* sp., que son parte del microbiota ótico normal, pueden aprovechar cualquiera de estos factores primarios para replicarse de manera exacerbada. Aunque también es sabido que bacterias Gram negativas que se encuentran en el medio ambiente pueden aprovechar y colonizar el oído (Korbelik *et al.* 2019).

Existen además los factores perpetuantes, que ocurren cuando el factor primario que originó la otitis se resuelve pero el proceso inflamatorio y los microorganismos oportunistas continúan manteniendo la enfermedad (Bajwa 2019). Entre los microorganismos más comunes de perpetuación están los *Staphylococcus* sp., *Pseudomonas* sp. y *Malassezia pachydermatis*. Debido a esto, muchos de los tratamientos para las otitis externas en perros fracasan e incluso, de avanzar la infección, pudiera llegar a lesionar el tímpano y generar una otitis media (Bajwa 2019).

En casos que el pabellón esté muy inflamado y no permita la completa observación del oído, se recomienda realizar un examen radiográfico para descartar daños más severos y que pueda tratarse de una otitis media con daño del tímpano (Logas 2013; Wiebe 2015). Se ha estimado que aproximadamente el 16% de las otitis externas agudas y el 50% de las crónicas, pueden convertirse en una otitis media con posible daño en tímpano (Coatesworth 2011).

2.2. Género *Staphylococcus* sp.:

Los estafilococos son cocos Gram positivos, de 0.5 a 1.5µm de diámetro, no motiles, pudiendo estar solos o agrupados en pares, tétradas, cadenas cortas o como racimos irregulares (Figura 1) (K. Hermans , L. A. Devriese 2010; Schleifer y Bell 2015). Son

bacterias mesófilas, pudiéndose encontrar en el ambiente dado que son anaerobias facultativas (pueden crecer en presencia o ausencia de oxígeno), excepto por *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius* y *Staphylococcus saccharolyticus* que son anaerobios estrictos (Bradley 2015).

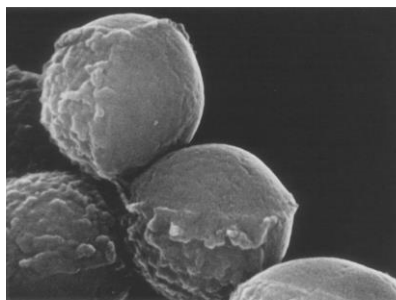


Figura 1. Género *Staphylococcus* sp. visualizado a través de un microscopio electrónico (Amako y Umeda 1977).

2.2.1. *Staphylococcus schleiferi*:

Descubierta en 1988, se le dio el nombre de especie *schleiferi* en honor al microbiólogo alemán Karl-Heinz Schleifer, en agradecimiento por su contribución en la taxonomía de bacterias Gram positiva (Bradley 2015). Esta bacteria fue aislada e identificada por primera vez en muestras de piel humana, determinándose así como parte de la microbiota cutánea (Freney *et al.* 1988; Bradley 2015).

2.2.2. *Staphylococcus schleiferi* subespecie *coagulans*:

En 1990, Igimi *et al.* aislaron bacterias fenotípicamente similares a *Staphylococcus intermedius* de perros con otitis externa, a excepción de algunas que producían reacción a la acetoina y no fermentaban trehalosa, que eran respuestas contrarias a estas. Entonces decidieron extraer el ADN para realizar un estudio de hibridación, hallando un alto nivel de homología con el *S. schleiferi*. Sin embargo, el *S. schleiferi* mantiene como uno de sus resultados ser negativo a la coagulasa, diferenciándolo del grupo de nuevas bacterias que fueron positivas a coagulasa. Por tal motivo, se determinó crear dos subespecies del *S. schleiferi*, *S. schleiferi* subsp. *schleiferi*, para la especie original de *S. schleiferi*, y *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, para este nuevo grupo de bacterias positivas a la coagulasa.

Años más tarde, Frank *et al.* (2003) determinaron que también es posible aislar esta cepa de perros con piodermias (superficiales y profundas). Así como Igimi *et al.* (1990) identificaron al *S. schleiferi* subsp. *coagulans* de cepas que se creían eran *S. intermedius*, Devriese *et al.* (2005) reafirmaron que es común dar un diagnóstico errado por la similitud dado que ambas mantienen una respuesta positiva a la coagulasa, y afirman que realizando un test por acidificación de trehalosa puede ser de utilidad para su diferenciación.

2.2.3. Etiología

Varios estafilococos como el *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, *S. aureus* subsp. *aureus*, *S. pseudintermedius*, *S. epidermidis* y el *S. felis* forman parte de la microbiota cutánea de los perros y que en ocasiones tienden a comportarse como patógenos oportunistas cuando el animal se encuentra inmunosuprimido o sufre de una lesión primaria, produciendo piodermias u otitis externas (Yamashita *et al.* 2005; Griffeth *et al.* 2008). Además, se ha descrito que el *S. schleiferi* subsp. *coagulans* puede encontrarse también en el tracto intestinal, tracto urogenital y en la mucosa anal (Yamashita *et al.* 2005; Muñoz *et al.* 2012)

Molinos Abós y Giménez Pérez (2005) describieron que de forma similar a lo que ocurre con el *S. lugdunensis*, el *S. schleiferi* produce infecciones especialmente agresivas e incluso equiparables a las causadas por *Staphylococcus aureus*. Su patogenia todavía se encuentra pendiente de dilucidar, por lo que la identificación correcta de estos aislamientos tiene particular importancia.

2.2.4. Importancia en la Salud Pública

El primer caso en humanos de *S. schleiferi* subsp. *coagulans* fue en un paciente con infección de la herida quirúrgica del dedo (Vandenesch *et al.* 1994). Si bien Leung *et al.* (1999) describieron el caso de una endocarditis con sospecha de *S. schleiferi*, no pudieron confirmar en su totalidad por falta de pruebas diagnósticas.

Un segundo reporte confirmado en humanos se dio en un paciente masculino que luego de recibir un trasplante de hígado, desarrolló endocarditis de la válvula aórtica junto a otras patologías como líquido ascítico, líquido sinovial y absceso paravertebral, donde luego de realizarle un hemocultivo se identificó al *S. schleiferi* subsp. *coagulans* meticilina resistente, que inicialmente se creía era un *S. aureus* (Kumar *et al.* 2007). Se presume que el contagio

se debió a que la persona tenía a su cuidado un perro con otitis y piodermias recurrentes, y que la última vez que lo presentó fue una semana antes que la persona fuera hospitalizada (Kumar *et al.* 2007).

El tercer caso fue de un paciente con insuficiencia cardiaca, quien presentó una infección luego de colocarle quirúrgicamente un dispositivo, donde identificaron al *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, clasificado en un principio como *S. aureus* (Thibodeau *et al.* 2012).

El cuarto caso reportado en humanos fue de un paciente con carcinoma hepatocelular, a quien luego de realizarle un hemocultivo se logró identificar al *S. schleiferi* subsp. *coagulans* con resistencia a la meticilina (Swe *et al.* 2016).

Se han comparado los genes de resistencia de *Staphylococcus* humanos y animales, encontrando que se comparten un gran número de estos, y que son muy pocos los genes de resistencia que son exclusivos para los humanos o animales (Schwarz *et al.* 2018).

2.2.5. Pruebas de identificación

2.2.5.1. Pruebas bioquímicas:

Las pruebas de coagulasa, Voges-Proskauer, Hemólisis, Maltosa y Trehalosa sirven de ayuda para la identificación de *Staphylococcus* sp. (Johansson *et al.* 2014), pero debido a su variabilidad y resultados similares, resulta ser inexacto (Cuadro 1).

- Catalasa: evalúa la presencia de la enzima catalasa, que descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. Su importancia radica en la diferenciación entre el género *Staphylococcus* de *Streptococcus*.
- Oxidasa: evalúa la presencia de la enzima citocromo oxidasa. Su importancia radica en la diferenciación del género *Staphylococcus* de *Micrococcus*.
- Hemólisis: realizando una siembra en agar sangre (ovino, bovino, equino) se puede evaluar la capacidad hemolítica de la bacteria. Se diferencian por ser hemólisis completa (β), incompleta (α) o nula (γ). Algunas bacterias como el *Staphylococcus aureus* han demostrado tener una doble hemólisis (α y β).
- Coagulasa libre: denominada estafilocoagulasa. Evalúa la presencia de esta enzima capaz de convertir el fibrinógeno en fibrina.

- Coagulasa fija: se utiliza para detectar el factor de aglutinación, que activa de manera indirecta la trombina.
- Voges-Proskauer: el test Voges-Proskauer revela la capacidad de la bacteria de formar acetil metil, más conocida como acetoína. La acetoína en presencia de oxígeno forma diacetilo, que en contacto con el α naftol y el hidróxido de potasio formarán un precipitado color rosado débil hasta un rojo intenso.
- Fermentación de carbohidratos: existe más de 20 carbohidratos usados para evaluar la capacidad fermentativa. Entre los más usados para el género *Staphylococcus* están manitol, maltosa y trehalosa.

Cuadro 1: Características diferenciales entre las especies del género *Staphylococcus*

	<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i>	<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i>	<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. intermedius</i>	<i>S. epidermidis</i>
Catalasa	+	+	+	+	+	+
Oxidasa	-	-	-	-	-	-
Coagulasa	+	-	+	+	+	-
Factor de aglutinación	-	+	+	-	v	-
Producción de acetoína	+	?	+	+	-	+
Hemólisis	β	β	α/β	α/β	+	+/-
Ureasa	?	-	+	+	+	+
Fermentación de:						
D-glucosa	+	+	+	+	+	+
Lactosa	v	-	+	+	v	+
Maltosa	-	-	+	w+	+	+
Sacarosa	v	-	+	+	+	+
D-manitol	v	-	+	w+	v	-
Trehalosa	-	v	+	+	+	-

Nota: +: positivo; -: negativo; v: variado; w+: débilmente positivo; ?: desconocido

2.2.5.2. Método de reacción en cadena a la polimerasa (PCR)

Las técnicas de identificación molecular en bacterias mediante la amplificación del gen ARNr 16S son muy comunes debido a que es una molécula universal, existen bases de datos de acceso libre (GenBank), presentan áreas conservadas y variables, y es útil para la diferenciación de distintas especies bacterianas (Rodicio y Mendoza 2004).

Al ser el gen ARNr 16S una molécula presente universalmente en las bacterias, hace que su identificación sea fácil, rápida y de bajos costos, pero es precisamente esta característica que le limita llegar a ser muy precisa al tratar de diferenciar ciertas especies y subespecies bacterianas (Rodicio y Mendoza 2004; Kosecka-Strojek *et al.* 2019).

Actualmente existen otras técnicas como el MALDI-TOF MS (Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry) o el NGS (Next-generation sequencing) que tienen un mayor porcentaje de éxito al identificar especies y subespecies bacterianas, pero por sus altos costos no serían factibles para todos los laboratorios (Kosecka-Strojek *et al.* 2019). A pesar de esto, hasta la fecha no existe una prueba molecular que pueda diferenciar en su totalidad a las subespecies del *Staphylococcus schleiferi*.

Yamashita *et al.* (2005) diseñaron un par de primers necesarios para la identificación del *S. schleiferi* mediante la amplificación de la región 1369pb, y para la diferenciación de las subespecies es necesario realizar la prueba de coagulasa, producción de acetoina (Voges-Proskauer), el tipo de hemólisis, y evaluar la fermentación de trehalosa y maltosa.

2.3. Resistencia bacteriana

2.3.1. Factores de virulencia

Los *S. schleiferi* poseen, al igual que el *S. epidermidis* y *S. lugdunensis*, una capa adicional de polisacáridos (exopolisacáridos) en su pared celular bacteriana, que facilita su

colonización e interfiere con la fagocitosis (Molinos Abós y Giménez Pérez 2005; K. Hermans , L. A. Devriese 2010).

La enzima coagulasa del *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, así como de otros CoPS, reacciona con la protrombina de la sangre convirtiéndola en estafilotrombina, permitiendo transformar el fibrinógeno a fibrina. Esto genera una capa de fibrina alrededor de la bacteria que pueden protegerlo de células fagocíticas. Mientras que la producción de catalasa, les permite sobrevivir dentro de las células fagocíticas (K. Hermans , L. A. Devriese 2010; Quin *et al.* 2011).

Además, pueden presentar una β toxina la cual daña las membranas celulares generando una β hemólisis, o una α toxina, un polipéptido que causa un desequilibrio osmótico de las células sanguíneas generando una α hemólisis (K. Hermans , L. A. Devriese 2010; Quin *et al.* 2011).

Una particularidad de los *Staphylococcus* como habitantes normales de piel, oídos y mucosas de los perros, es que están en constante contacto con otras bacterias propias también del animal. Esto conlleva a un intercambio del material genético entre los *Staphylococcus* no sólo intraespecies e interespecies, sino también entre otros grupos de bacterias Gram positivas (Schwarz *et al.* 2018).

En resumidas cuentas, la resistencia a los antibióticos se produce como resultado de la inactivación del fármaco, modificación de la diana del mismo, o por una disminución en la concentración intracelular a causa de una reducción en la permeabilidad de la membrana (Quin *et al.* 2011).

2.3.2. Sensibilidad a los antimicrobianos

En el estudio realizado por Bemis *et al.* (2006), el 59% de 37 aislamientos de *S. schleiferi* subsp. *coagulans* resultaron resistentes a la oxacilina, mediante la prueba de aglutinación en látex PBP2a realizada en PCR.

Muñoz *et al.* (2012) realizaron el método de Secuenciación-PCR para los genes *gyrA* y *gyrB* a una cepa de *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans*, obtenida de una muestra de

otitis, que mostró resistencia fenotípica a enrofloxacino. Donde obtuvieron una mutación en el codón 84 para el gen *gyrA* y en el codón 80 para el gen *gyrA*.

La preocupación de muchos clínicos es no poder saber si el antibiótico a elegir pueda generar una ototoxicidad, como es el caso de los aminoglucósidos, pero felizmente existen antibióticos como las fluoroquinolonas que dan seguridad en el tratamiento de otitis externa e incluso en otitis media (Logas 2013).

Una investigación de sensibilidad antimicrobiana en Australia demostró que el *S. pseudintermedius* tiene una alta sensibilidad a la gentamicina (99%), a la neomicina (96%), y a la ciprofloxacina (98%) (Bugden 2013). Pero por otro lado, en Brasil se realizó una prueba similar al *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, donde la sensibilidad fue menor en la gentamicina (37.5%) y a la neomicina (12.5%), sólo la ciprofloxacina demostró tener una buena respuesta antimicrobiana (75%) (Penna *et al.* 2010).

Si bien el número de *S. schleiferi* subsp. *coagulans* detectados por Penna *et al.* (2010) fueron sólo ocho de 91 cepas de estafilococos, seis de estos fueron resistentes a la oxacilina. Mientras que en las pruebas realizadas por Muñoz *et al.* (2012), identificaron que de las 11 cepas de *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, todos mostraron sensibilidad a la oxacilina.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Diseño del estudio

Se realizó un estudio prospectivo en 148 muestras de hisopados de secreciones óticas producto de otitis externas caninas provenientes de la Clínica de Animales Menores de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, durante los meses de enero a junio del 2018.

3.2. Lugar de ejecución y periodo de duración

Las muestras fueron tomadas en la Clínica de Animales Menores de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, para luego ser procesadas en el Laboratorio de Microbiología y Parasitología – Sección Bacteriología y Micología, durante los meses de enero a diciembre del 2018.

3.3. Descripción y tamaño de muestra

Se procesaron todas las muestras de secreciones óticas caninas provenientes de la CAME FMV UNMSM durante los meses de enero a junio. Las muestras fueron de perros de cualquier raza, edad y sexo; sólo fueron excluidos aquellos perros que recibieron tratamiento antibiótico tópico y/o sistémico durante los últimos 5 días. Se procesaron en total 148 muestras de secreciones óticas caninas de los cuales 112 fueron identificados como *Staphylococcus* sp., con las cuales se desarrolló este trabajo.

3.4. Materiales, equipos, reactivos y medios de cultivo

- Instrumental de laboratorio: Hisopos estériles, tubos de vidrio estériles, asa bacteriológica de siembra, pinza plana de mano izquierda, láminas porta objetos, placas petri descartables 100 x 15mm estériles, gradillas, aceite de inmersión, goteros de 30mL, agua destilada, escala de McFarland 0.5 (1.5×10^8 UFC/mL), microviales de 1.5mL y 2mL, pipetas (10 μ L, 100 μ L y 1000 μ L), tips (10 μ L, 100 μ L y 1000 μ L).
- Material bioquímico: Agar Tripticasa de Soya (TSA), Agar MacConkey (MC), Agar Müller-Hinton (MH), Agar Manitol Salado (Man), Agar Trehalosa (Th), Caldo Voges-Proskauer (V-P), sangre desfibrinada de ovino, Plasma liofilizado de conejo, Peróxido de hidrógeno, α -naftol 5%, Hidróxido de potasio 40%, Cloruro de Sodio, Caldo Tripticasa de Soya (TSB), Glicerol 50%, Tinción cristal violeta, Lugol, Alcohol acetona, Safranina, Kit de extracción de ADN para bacterias Gram positivas, discos de antibióticos, marcador molecular de 1.5Kb, buffer de carga, gel de agarosa, Tris-Borato-EDTA (TBE), agua ultra pura para diagnóstico molecular, MasterMix, y un par de primers.
- Material de bioseguridad: Mandil o bata blanca, mascarilla, guantes de látex y nitrilo, mechero a gas, lentes con protección UV.
- Equipos electrónicos: Cabina UV para PCR, Termociclador, Electroforesis, Congeladora de -20°C, Centrífuga de 16000 rpm, Minicentrífuga/agitador vortex, Estufa de incubación a 37°C, Microscopio.

3.5. Identificación de las muestras

Todas las muestras provenientes de la Clínica de Animales Menores de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos fueron registradas bajo un código interno del Laboratorio de Microbiología y Parasitología – Sección Bacteriología y Micología. Para el presente estudio se creó un código independiente para todas las cepas positivas a *Staphylococcus* sp., donde se detalla la fecha de recepción, distrito de procedencia, raza, sexo y edad del perro (Cuadro A1).

3.6. Procesamiento de las muestras

3.6.1 Toma de muestra

Las muestras fueron obtenidas mediante un hisopado del oído externo usando un hisopo estéril, transportadas en unos tubos estériles y procesados a la brevedad. En algunos casos se trataba de una otitis bilateral, por lo que la toma de muestra se realizó en ambos oídos y procesado de manera independiente.

3.6.2 Aislamiento bacteriológico

Las muestras de los hisopados fueron cultivadas bajo condiciones estándares en agar tripticasa de soya (TSA) y agar MacConkey (MC) mediante una siembra por agotamiento e incubadas a 37°C por 24 horas (Frank *et al.* 2003).

3.6.3 Identificación preliminar

La identificación del género *Staphylococcus* sp. se realizó mediante características fenotípicas de las colonias como color blanquecino, forma redondeada, bordes definidos, una leve elevación, además de una tinción Gram observando cocos Gram positivos agrupados en racimos y, siendo positivas a la prueba de catalasa y negativas a oxidasa (Yamashita *et al.* 2005).

Todos los aislados positivos a *Staphylococcus* sp. fueron criopreservados usando glicerol al 15% y congeladas a -20°C para su posterior identificación bioquímica y molecular (Hubálek 2003). La criopreservación se realizó incubando de 2 a 3 colonias bacterianas de cada aislado en tubos con 3mL de caldo tripticasa de soya (TSB) durante 2 horas a 37°C. De cada muestra incubada, se extrajo 0.75mL a un vial de 1.5mL, luego se le agregó 0.25mL de glicerol al 40% y fueron puestas a congelación a 20°C.

3.6.4 Pruebas bioquímicas

De los viales con los aislados criopreservados, se extrajo 10μL para cultivarlas en agar sangre de ovino al 5% a 37°C por 24 horas, y se realizaron las siguientes pruebas:

- Hemólisis: Se evaluó la capacidad de generar hemólisis en el agar sangre, siendo β cuando hay una hemólisis completa, α cuando es incompleta, γ cuando no existe hemólisis, o una doble hemólisis como resultado de una combinación entre β y α .
- Coagulasa: Se utilizó el producto Bactident® Coagulase (Registro Merck 1.13306.0001), el cual contiene plasma de conejo liofilizado con EDTA. Cada frasco del producto fue hidratado con 3mL de agua destilada.
 - a. Coagulasa libre (en tubo): se repartió 0.3mL en viales de 2mL, a los cuales se le añadieron 2 colonias de cada aislado de *Staphylococcus* sp. a evaluar. Se incubaron a 37°C durante 4 horas, con revisiones cada hora para comprobar la formación del coágulo fijo en el fondo del vial. Aquellos aislados que dieron negativo a las 4 horas, se las dejó a temperatura ambiente (20-25°C) durante 20 horas más para comprobar el resultado negativo.
 - b. Coagulasa fija (en placa): en una lámina portaobjeto se colocó 1 gota de plasma de conejo y se le adicionó 1 colonia del aislado de *Staphylococcus* sp. a evaluar. Se homogenizó continuamente por 10 minutos. De ser positiva, se observaría microaglutinaciones, y de ser negativa no ocurriría ningún cambio.
- Producción de acetoina: Se prepararon tubos con 3mL de caldo Voges-Proskauer (Registro Merck 1.05712.0500) a los cuales se les cultivaron 2 colonias de los aislados de *Staphylococcus* sp. a evaluar y se incubó por 48 horas. Pasado ese tiempo, se homogenizó la muestra con ayuda de un vórtex. Se extrajo 1mL del caldo para ser colocado en un nuevo tubo estéril, donde se le añadieron 10 gotas de α -naftol al 5% y 10 gotas de KOH al 40%, en ese orden. Transcurrido 10 minutos se hizo la lectura, donde se buscaba la formación de una superficie de color rojiza para dar la prueba como positivo.
- Fermentación de carbohidratos: Para este estudio, se evaluaron el manitol y la trehalosa. Usando el rojo de fenol como indicador de pH, la muestra vira a un color amarillo si el resultado es positivo a la fermentación del carbohidrato o vira a un color fucsia de ser negativo.

3.6.5 Identificación molecular del *S. schleiferi* subsp. *coagulans*

A. Extracción del ADN:

- a. Del crecimiento bacteriano en el agar sangre, se extrajeron 2 colonias para ser incubadas en un vial con 1.5mL de caldo tripticasa de soya a 37°C por 2 horas, para alcanzar un concentrado aproximado de 2×10^9 bacterias.
- b. De cada muestra, se traspasó a un nuevo vial para ser centrifugado a 5000 rpm por 10 minutos, quedándose un concentrado bacteriano en el fondo y descartando el sobrenadante.
- c. Agregando 180µL de búfer de lisis para bacterias Gram positivas (20mM de Tris-HCl, 2mM EDTA, 1.2% Triton X-100, 20mg/mL de lisozima), se incubó a 37°C por 30 minutos.
- d. Se continuó con los pasos indicados en el *kit GeneJET Genomic DNA Purification*TM (Thermo Fisher Scientific), hasta obtener un producto y ponerlo en congelación a -20°C hasta su procesamiento en el termociclador (Cuadro A2).

El producto de la extracción fue evaluado usando el Espectrofotómetro/Fluorómetro DeNovix[®] modelo DS-11FX, obteniendo valores de las concentraciones expresados en ng/µL. Dado que las muestras provienen de aislados bacterianos puros y se usó el *kit GeneJET Genomic DNA Purification*TM, el cual garantiza la calidad de ADN extraído, no se realizaron pruebas adicionales.

B. Mezcla de los componentes para PCR:

- a. Primers: Se utilizaron un par de primers para amplificar la región de 1369pb de la secuencia de ADNr 16S de *S. schleiferi* subsp. *coagulans*: Primer 1 forward 5'-GAACGGACAAGGAGCTTGCTCCTTTGAA-3' y primer 2 reverse 5'-GTTACAACTCTCGTGGTGTGAA-3' (Yamashita *et al.* 2005). Los pesos de los primers fueron de 33.27nmol y 37.47nmol, del forward y reverse respectivamente. Los primers fueron hidratados con agua ultra pura, se dividieron en microviales a un peso de 10µM y de ahí se fueron extrayendo 1µL de cada primer por cada muestra.

- b. MasterMix: Se utilizó el 2XPCR HotStart MasterMix (abm[®]), el cual contiene ADN polimerasa, nucleótidos, y buffer de reacción. En un vial estéril se realizó una dilución para tener el MasterMix a 1X.

En una cabina previamente esterilizada por UV, se mezclaron en microviales de 0.2mL: 7μL de agua ultra pura OmniPur[®] WFI Quality Water (Calbiochem[®]), 10μL de MasterMix a 1X, 1μL de cada primer (forward y reverse) y 1μL del producto de la extracción del ADN. Las mezclas preparadas de 20μL cada una, fueron colocadas en el termociclador para lograr la amplificación del segmento deseado.

- C. Amplificación: La amplificación se realizó en un termociclador (Biometra GmbH Analytik Jena AG), usando 30 ciclos del siguiente protocolo:
 - a. Desnaturalización: 1 minuto a 94°C.
 - b. Alineamiento: 1 minuto a 57°C.
 - c. Elongación: 2 minutos a 72°C.

Para corroborar la presencia de un único fragmento en la región 1369pb, se tomó 1μL del producto del PCR para analizarla mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% en Tris-Borato-EDTA (TBE) (Clever Scientific Ltd) búfer a 90V por 90 minutos (Yamashita *et al.* 2005). Se preparó el gel de agarosa al 2% diluyendo 1.60g de agarosa Sigma-Aldrich (A9539-100G) en 80mL de TBE al 0.5X (45mM de Tris, 45nM de ácido bórico y 1nM EDTA) (Kawakami *et al.* 2010). Se puso a calentar en el microondas hasta su ebullición y completa dilución, luego se dejó enfriar por 5 - 10 minutos, moviendo constantemente envase, y se colocó en el molde para electroforesis hasta su solidificación. Fue necesario el 100bp Plus Opti-DNA Marker (abm[®] G016) como marcador hasta 1500 pares de base, y el Safe-Green[™] (abm[®] G108-G) como búfer de carga.

En una proporción de 1:5 (búfer de carga : muestra), las muestras fueron distribuidas empezando por el marcador 100bp de 1.5Kb, un control negativo en blanco usando sólo agua ultra pura, una muestra como control positivo seleccionado durante el proceso de estandarización, y el resto de muestras a evaluar.

El equipo de electroforesis usado fue nanoPAC-300P (Clever Scientific Ltd). Transcurrido el tiempo de la electroforesis, se retiró el gel de la cubeta y fue colocado

en la pantalla de UV safeVIEW-Mini2 (*Cleaver Scientific Ltd*), donde se observaron si las muestras evaluadas se marcaban en la región 1369pb.

3.6.6 Purificación y secuenciación de los amplificadores del gen ARNr 16S

Para la verificación de la especificidad de los productos del PCR para el *S. schleiferi*, dos muestras correspondientes a dos aislados que resultaron positivos durante las pruebas fueron enviadas al Laboratorio Magrogen en Corea. De acuerdo al protocolo establecido por el Laboratorio Macrogen, se envió 50µL de producto del PCR de las muestras S027 y S058, además de 20µL de cada primer (forward y reverse). El laboratorio Macrogen se restringe a compartir la información del método de purificación que realizaron. El método de secuenciación usado fue el Sanger automatizado, el cual se basa en una modificación del PCR con dideoxinucleótidos marcados con fluoróforos, los cuales son leídos por electroforesis capilar y la información obtenida se le conoce como electroferograma o cromatograma (Quin *et al.* 2011).

3.6.7 Prueba de sensibilidad antimicrobiana

Se realizó la técnica de dilución en agar siguiendo el método de Kirby-Bauer (Sacaquispe Contreras y Velásquez Pomar 2002; Quin *et al.* 2011). De los aislados bacterianos en el agar sangre, se prepara una dilución de 1 a 2 colonias en un tubo con 1mL de cloruro de sodio al 0.9% hasta alcanzar una turbidez de 0.5 en la escala de McFarland, el cual representa una cantidad de 1.5×10^8 bacterias en 1mL. Se introdujo un hisopo estéril en el tubo con la dilución por 30 segundos, se realizó un sembrado en agar Müller Hilton siguiendo un patrón de crecimiento en césped y se procedió a colocar los discos antimicrobianos. Los antibióticos probados en este estudio fueron de la marca OXOID. Los agentes antimicrobianos seleccionados fueron gentamicina (CN), cefalexina (CL), oxacilina (OX), clindamicina (DA), nitrofurantoína (FD), ciprofloxacina (CIP), neomicina (N), doxiciclina (DO) y amoxicilina con ácido clavulánico (AMC); antibióticos comúnmente usados en tratamientos para otitis externas caninas (Penna *et al.* 2010; Muñoz *et al.* 2012; Wiebe 2015). Las placas fueron incubadas a 37°C por 24 horas.

Los halos de inhibición resultantes fueron leídos e interpretados siguiendo los puntos de corte propuestos por el Instituto de Estándares Clínicos y Laboratoriales (CLSI) (Cuadro 2).

Cuadro 2: Rangos de sensibilidad antimicrobiana de acuerdo a cada antibiótico. Puntos de corte establecidos por el Instituto de Estándares Clínicos y Laboratoriales (CLSI).

FAMILIA DEL				HALO DE INHIBICIÓN (mm)		
ANTIBIÓTICO	ANTIBIÓTICO	SIGLA	POTENCIA	RESISTENTE	INTERMEDIO	SENSIBLE
Aminoglucósido	Gentamicina	CN	30 µg	≤12	13 – 14	≥15
	Neomicina	N	30 µg	≤12	13 – 16	≥17
Penicilinas	Oxacilina	OX	1 µg	≤17		≥18
	Amoxicilina + ácido clavulánico	AMC	20/10 µg	≤19		≥20
Cefalosporina	Cefalexina	CL	30 µg	≤14	15 – 17	≥18
Lincosamida	Clindamicina	DA	2 µg	≤14	15 – 20	≥21
Nitrofurano	Nitrofuratoína	FD	300 µg	≤14	15 – 16	≥17
Fluoroquinolona	Ciprofloxacina	CIP	5 µg	≤15	16 – 20	≥21
Tetraciclina	Doxiciclina	DO	30 µg	≤12	13 – 15	≥16

IV. RESULTADOS

4.1 Aislamiento de *Staphylococcus* sp.

De los 148 casos de otitis externas caninas, se identificaron 112 aislados siendo estos cocos Gram positivos agrupados en racimos, positivos a la prueba de catalasa y negativos a la prueba de oxidasa, compatibles con *Staphylococcus* sp.

4.2 Identificación bioquímica del *Staphylococcus* sp. (Cuadro 3):

- Hemólisis: siendo β una hemólisis completa, α una hemólisis parcial, γ cuando no hay hemólisis, y $\alpha\beta$ cuando hay una doble hemólisis; 96 presentaron una hemólisis β (85,7%), 13 una hemólisis α (11,6 %), 2 una hemólisis γ (1,8%), y sólo una muestra presentó una doble hemólisis $\alpha\beta$ (0,9%).
- Coagulasa libre: 76 (67,9%) resultaron ser positivas hasta las 4 horas, 29 (25,9%) mantuvieron un resultado negativo hasta las 4 horas, pero fueron positivas a las 24 horas, y 7 (6,3%) fueron negativas hasta las 24 horas.
- Fermentación de manitol: 16 (14,3%) fermentaron completamente el manitol, 80 (71,4%) no fermentaron, y 16 (14,3%) fermentaron débilmente el manitol.
- Fermentación de trehalosa: 64 (57,1%) fueron positivos a la fermentación, mientras que 48 (42,9%) fueron negativos.
- Producción de acetoina: 25 (22,3%) fueron positivos a la producción de acetoina y 87 (77,7%) fueron negativos.

Cuadro 3: Perfil bioquímico de los 112 asilados de *Staphylococcus* sp.

CÓDIGO	PRUEBAS BIOQUÍMICAS				
	Tipo de hemólisis	Coagulasa en tubo	Fermenta		Producción de acetoina
			Manitol	Trehalosa	
S001	β	+4 horas	-	-	-
S002	β	+4 horas	-	-	-
S003	β	-4h / +24h	-	+	-
S004	β	+4 horas	-	+	-
S005	β	+4 horas	-	+	-
S006	β	+4 horas	-	+	-
S007	β	+4 horas	-	+	-
S008	β	+4 horas	-	+	-
S009	β	+4 horas	-	+	-
S010	β	+4 horas	+	+	-
S011	αβ	+4 horas	+	+	-
S012	β	+4 horas	-	+	+
S013	β	+4 horas	-	+	-
S014	β	+4 horas	-	-	-
S015	β	+4 horas	-	-	-
S016	β	+4 horas	-	+	-
S017	β	-4h / +24h	d+	-	-
S018	β	+4 horas	-	+	+
S019	β	+4 horas	-	-	+
S020	α	- 24 horas	+	+	+
S021	β	+4 horas	-	+	-
S022	β	+4 horas	d+	-	+
S023	β	+4 horas	-	+	-
S024	β	-4h / +24h	-	+	-
S025	β	+4 horas	-	+	-
S026	β	+4 horas	-	-	+
S027	β	+4 horas	-	-	+
S028	β	+4 horas	d+	-	+
S029	β	-4h / +24h	d+	-	+
S030	β	+4 horas	d+	-	+
S031	β	-4h / +24h	d+	-	+
S032	β	+4 horas	-	+	-

S033	β	+4 horas	-	+	-
S034	β	-4h / +24h	-	+	-
S035	α	-4h / +24h	+	+	-
S036	β	+4 horas	-	+	+
S037	γ	-4h / +24h	+	+	-
S038	β	-4h / +24h	+	+	-
S039	β	+4 horas	-	+	-
S040	β	+4 horas	-	+	-
S041	β	-4h / +24h	-	-	+
S042	β	-4h / +24h	-	+	+
S043	β	-4h / +24h	-	+	-
S044	β	-4h / +24h	-	+	-
S045	β	+4 horas	-	+	-
S046	β	-4h / +24h	-	+	-
S047	β	+4 horas	d+	+	-
S048	β	+4 horas	d+	+	-
S049	α	+4 horas	d+	+	-
S050	β	+4 horas	-	+	-
S051	β	+4 horas	d+	+	-
S052	β	-4h / +24h	d+	+	-
S053	β	-4h / +24h	-	+	-
S054	β	+4 horas	-	+	-
S055	β	-4h / +24h	-	+	-
S056	β	+4 horas	-	+	-
S057	β	+4 horas	+	-	+
S058	β	+4 horas	-	-	+
S059	β	-4h / +24h	-	-	+
S060	β	+4 horas	-	-	+
S062	β	-4h / +24h	-	+	-
S063	α	-4h / +24h	d+	-	+
S064	β	-4h / +24h	d+	-	+
S066	β	+4 horas	+	+	-
S067	β	-4h / +24h	-	+	-
S068	α	-4h / +24h	-	+	-
S069	α	-24 horas	+	+	-
S070	β	-24 horas	+	+	-

S071	β	+4 horas	-	+	-
S072	β	+4 horas	-	+	-
S073	β	+4 horas	-	+	-
S074	γ	+4 horas	-	-	-
S075	α	-24 horas	+	+	+
S076	α	-24 horas	-	-	-
S077	β	-24 horas	-	-	+
S078	β	+4 horas	-	-	+
S079	β	+4 horas	-	-	-
S080	β	-4h / +24h	-	-	-
S081	α	+4 horas	-	-	-
S082	α	+4 horas	d+	-	-
S083	α	+4 horas	-	-	-
S084	β	-24 horas	-	-	-
S085	β	+4 horas	-	-	-
S086	α	+4 horas	-	-	-
S087	β	-4h / +24h	-	-	-
S088	β	-4h / +24h	-	-	-
S089	β	+4 horas	-	-	-
S090	β	+4 horas	-	-	-
S091	β	+4 horas	-	-	-
S092	β	+4 horas	-	-	-
S093	β	+4 horas	-	-	-
S094	α	+4 horas	-	-	-
S095	β	+4 horas	+	-	+
S096	β	+4 horas	-	-	-
S097	β	-4h / +24h	-	-	-
S098	β	-4h / +24h	-	-	-
S099	β	+4 horas	-	-	-
S100	β	+4 horas	-	-	-
S101	β	+4 horas	+	+	-
S103	β	+4 horas	-	+	-
S104	β	-4h / +24h	-	+	-
S105	β	+4 horas	+	+	-
S106	β	+4 horas	+	+	-
S107	β	+4 horas	-	+	-

S108	β	+4 horas	-	+	-
S109	β	+4 horas	-	+	-
S110	β	+4 horas	-	-	-
S111	β	+4 horas	-	+	-
S113	β	+4 horas	d+	+	-
S115	β	+4 horas	+	-	+
S116	β	+4 horas	-	+	-
S117	β	+4 horas	-	+	-

Nota: “+”: positivo; “-”: negativo; “d+”: débilmente positivo.

4.3 Identificación molecular del *S. schleiferi* subsp. *coagulans*

4.3.1 Extracción de ADN

Los productos de la extracción fueron analizados por espectrofotometría para evaluar la cantidad de ADN, obteniéndose valores desde 17,269ng/μL hasta los 368,770ng/μL, en promedio 77,159ng/μL (Figura 2).

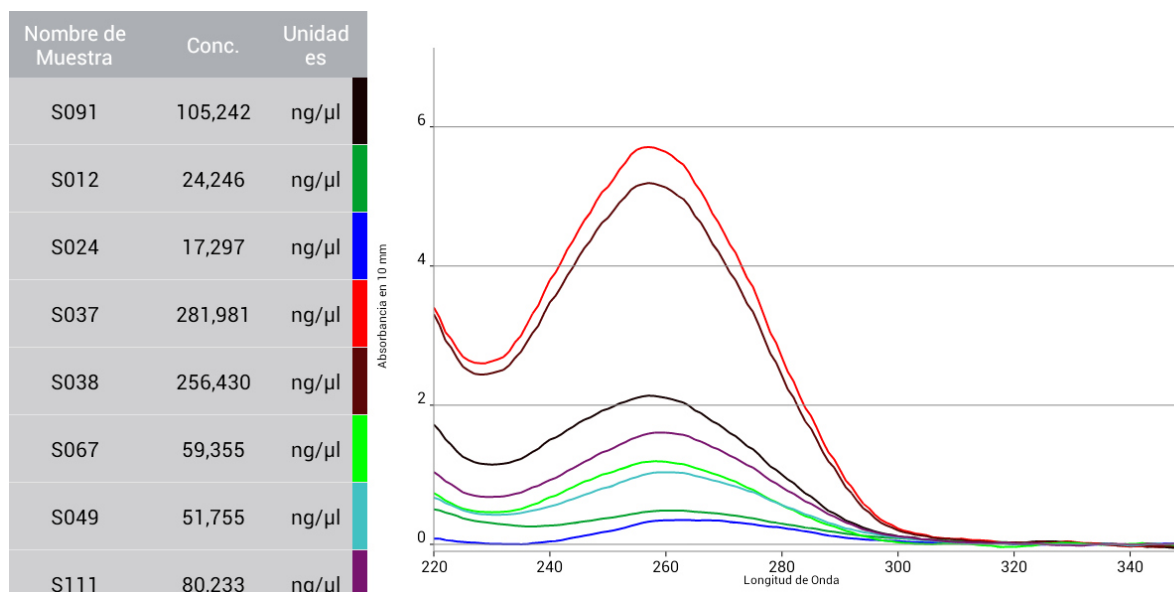


Figura 2: Gráfica de las concentraciones de ADN analizadas por espectrofotometría.

4.3.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Los productos de PCR de los 112 aislados de *Staphylococcus* sp. fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. De los cuales, 34 muestras (30%) amplificaron al gen ARN 16S, obteniendo un producto único de 1369pb correspondiente al *Staphylococcus schleiferi* (Figura 3).

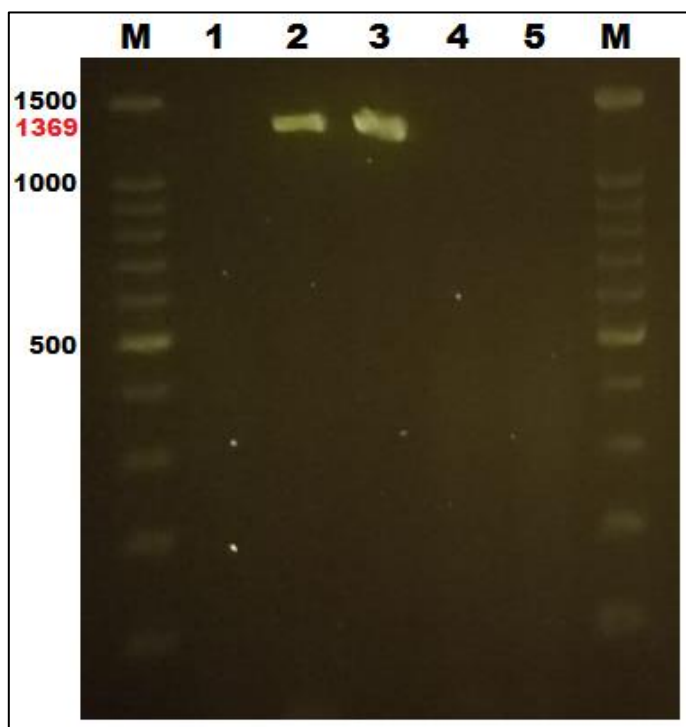


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Carriles: M, marcador de peso molecular 1.5Kb; 1, muestra en blanco (agua ultra pura); 2, aislado S027 con la banda en la región 1369pb; 3, aislado S058 con la banda en la región 1369pb; carril 4, cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 4330); carril 5: *Staphylococcus pseudintermedius* (cepa perteneciente al Laboratorio de Microbiología y Parasitología – Sección Bacteriología y Micología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos).

Debido a que la identificación mediante la amplificación del gen ARN 16S no es contundente para diferenciar las subespecies del *Staphylococcus schleiferi*, la identificación completa se logra con los resultados positivos a la prueba de coagulasa en tubo y negativos al factor de aglutinación, obteniendo así la seguridad que los 34 aislados fueron positivos al *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans*. Así mismo, todos los aislados fueron hemolíticos, donde 30 (88,2%) de ellos fueron del tipo β y 4 (11,8%) del tipo α . Se resumen los resultados de las pruebas bioquímicas, realizando una comparación con los resultados descritos por Igimi *et al.* (1990) (Cuadros 4 y 5):

Cuadro 4: Lista de los aislados positivos a *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans*

<i>Staphylococcus schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i>			
S012	S031	S055	S095
S017	S039	S057	S103
S019	S040	S058	S104
S022	S041	S059	S113
S026	S042	S060	S115
S027	S044	S063	S116
S028	S045	S064	S117
S029	S046	S087	
S030	S049	S088	

Cuadro 5: Resumen comparativo de las características bioquímicas del *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans*

Características	<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i>	
	Igimi <i>et al.</i>	En este estudio
Coagula plasma de conejo	+	+
Factor de aglutinación	-	-
Hemólisis	+	+
Producción de acetoína	+	v
Fermentación de:		
Manitol	v	v
Trehalosa	-	v

Nota: +: más del 90% positivo; -: más del 90% negativo; v: 11 a 89% positivo.

4.4 Purificación y secuenciación

Los productos de PCR de los aislados S027 y S058 fueron enviadas al Laboratorio Macrogen Corea donde realizaron la purificación y posterior secuenciación mediante el método de Sanger. Las secuencias de nucleótidos obtenidas fueron cotejadas utilizando el programa Lasergen versión 7.0.0, donde se utilizó el EditSeq para corregir los errores en la lectura de nucleótidos y luego se usó MegAlign, que usa el algoritmo ClustalW, para alinear las secuencias. Las secuencias de los consensos de los aislados S027 y S058 fueron analizadas con la Herramienta de Búsqueda de Alineamiento Local Básico (BLAST, por sus siglas en inglés) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y alineadas a las secuencias de referencia depositadas en el GenBank (versión 233.0), donde se obtuvo un 100% de semejanza con el *Staphylococcus schleiferi*.

Dado que el gen ARNr 16S tiene zonas altamente conservadas, es normal que exista altos porcentajes de homogeneidad con otras especies del género *Staphylococcus*. Para poder garantizar que los primers sólo van a reconocer y amplificar las regiones del *S. schleiferi*, estos fueron analizados con el BLAST. El primer forward obtuvo un porcentaje de identidad del 100% con el *Staphylococcus schleiferi* y un 96,43% con las bacterias *S. equorum*, *S. succinus*, *S. saprophyticus* y *S. haemolyticus*. Mientras que el primer reverse obtuvo un 100% de identidad para el *Staphylococcus schleiferi*, *Bacillus* sp., *Streptococcus equinus*, *Exiguobacterium aurantiacum* y *Lysinibacillus sphaericus*. De esta manera se comprueba que al realizar un PCR, ambos primers reconocen y amplifican al gen ARNr 16S del *Staphylococcus schleiferi*.

Las secuencias de los aislados S027 y S058 se encuentran depositados en el GenBank con los códigos MN497847 y MN497848, respectivamente.

4.5 Sensibilidad antimicrobiana

La sensibilidad antimicrobiana de los 34 aislados confirmadas como *S. schleiferi* subsp. *coagulans* fue de un 73.5% (25/34) para la gentamicina, 61.8% (21/34) para oxacilina, 61.8% (21/34) para cefalexina, 70.6% (21/34) para clindamicina, 97.1% (33/34) para nitrofurantoína, 58.8% (20/34) para ciprofloxacina, 76.5% (26/34) para neomicina, 79.4% (27/34) para doxiciclina, y 61.8% (21/34) para amoxicilina con ácido clavulánico (Cuadro 6)

(Figura 4). De las 34 cepas evaluadas, 17 mostraron ser multirresistentes a 3 o más antibióticos, siendo la S046 la que mostró una resistencia a 6 de los 9 antibióticos probados (gentamicina, oxacilina, cefalexina, clindamicina, ciprofloxacina, y amoxicilina con ácido clavulánico) (Figura 5).

Cuadro 6: Sensibilidad antimicrobiana de *S. schleiferi* subsp. *coagulans*

CÓDIGO	INTERPRETACIÓN DE LA SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA								
	CN	OX	CL	DA	FD	CIP	N	DO	AMC
S012	R	S	S	I	S	R	R	R	S
S017	R	R	R	I	S	R	I	I	R
S019	S	S	S	R	S	S	S	S	S
S022	R	S	S	S	S	R	I	S	S
S026	R	S	S	I	S	R	I	R	S
S027	S	S	S	S	S	S	S	S	S
S028	S	R	R	S	S	I	S	S	R
S029	S	R	R	S	S	I	S	S	R
S030	S	S	S	I	S	I	S	R	S
S031	S	R	R	I	S	R	S	R	R
S039	S	S	S	S	S	S	S	S	S
S040	S	S	S	S	S	S	S	S	S
S041	S	S	S	S	S	S	S	S	S
S042	S	S	S	S	S	S	S	S	S
S044	R	S	S	R	S	S	R	S	S
S045	R	S	S	I	S	R	I	R	S
S046	R	R	R	R	S	R	I	S	R
S049	S	R	R	S	S	S	S	S	R
S055	S	R	R	R	S	S	R	I	R
S057	S	S	S	S	S	I	S	S	S
S058	S	S	S	S	S	S	S	S	S
S059	S	R	R	S	R	S	S	S	R
S060	S	S	S	S	S	S	S	S	S
S063	S	R	R	S	S	I	S	S	R
S064	S	R	R	S	S	I	S	S	R
S087	S	S	S	S	S	S	S	S	S

S088	S	S	S	S	S	S	S	S	S
S095	S	S	S	S	S	S	S	S	S
S103	S	S	S	S	S	S	S	S	S
S104	S	S	S	S	S	I	S	S	S
S113	S	S	S	S	S	S	S	S	S
S115	S	S	S	S	S	S	S	S	S
S116	R	S	S	S	S	S	S	S	S
S117	R	S	S	S	S	S	S	S	S

Nota: CN, gentamicina; OX, oxacilina; CL, cefalexina; DA, clindamicina; FD, nitrofurantoína; CIP, ciprofloxacina; N, neomicina; DO, doxiciclina; AMC, amoxicilina con ácido clavulánico.

R, resistente; S, susceptible; I, intermedio. Puntos de corte establecidos por el CLSI.

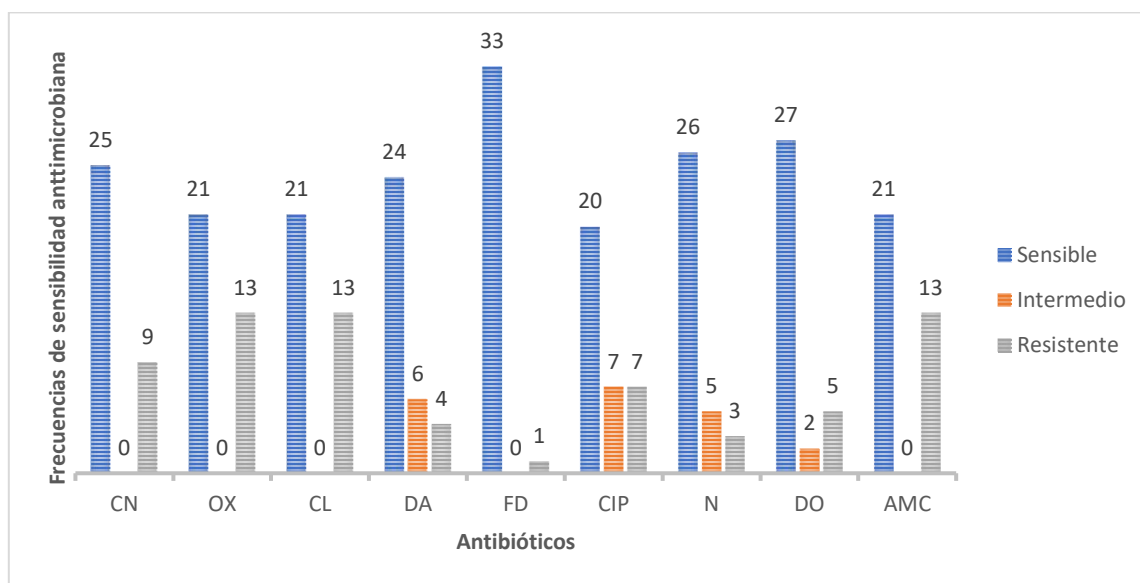


Figura 4. Frecuencias de la sensibilidad antimicrobiana de acuerdo a cada antibiótico probado. Puntos de corte establecidos por el CLSI.

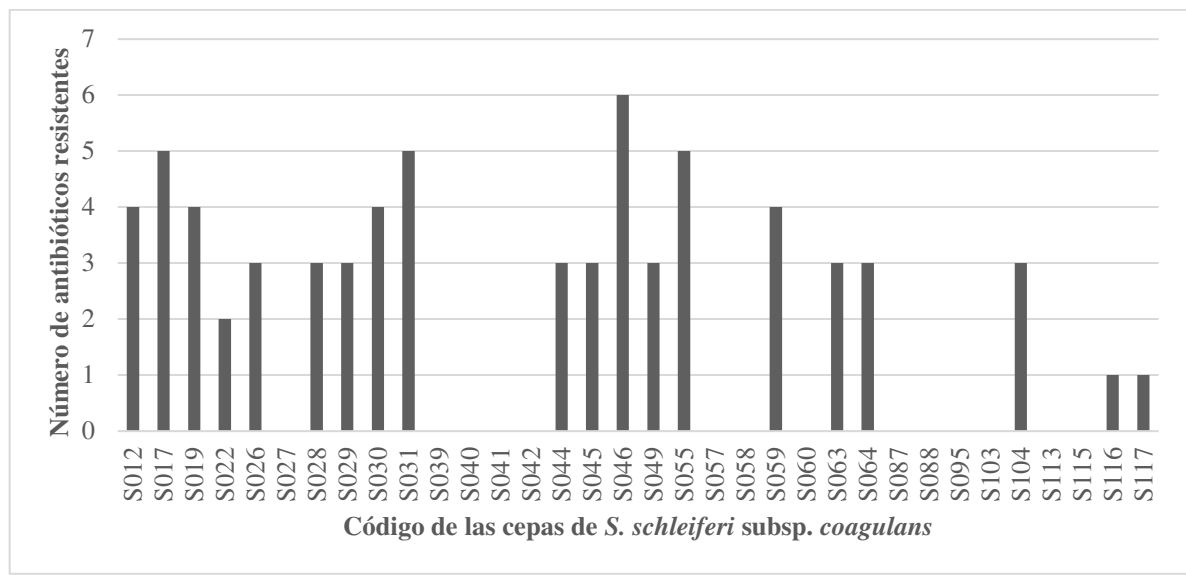


Figura 6. Número de resistencias a grupos de antibióticos que presentan los 34 aislados de *S. schleiferi* subsp. *coagulans*.

V. DISCUSIÓN

Con excepción del estudio realizado por Bugden (2013) en Australia, donde el 35% (1256/3541) de las bacterias aisladas de otitis externas fue la *Pseudomonas auriginosa*, varios estudios demuestran que el *Staphylococcus* sp. es la principal bacteria hallada en las otitis externas caninas, encontrándose en un rango de 50-60% (Yamashita *et al.* 2005; Penna *et al.* 2010; Muñoz *et al.* 2012; Zur *et al.* 2016). En este estudio se comprobó que el 75,68% (112/148) de las muestras fueron positivas a este género. Lo cual se explicaría debido a que *Staphylococcus* sp. es la principal bacteria del microbiota.

El presente estudio determinó que el 30,36% (34/112) de las cepas de *Staphylococcus* sp. aisladas de otitis externas caninas fueron identificadas como *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, superando el total de muestras identificadas por Muñoz *et al.* (2012) de 21.15% (11/52) y al de Penna *et al.* (2010) de 8.79% (8/91). Esto podría deberse a que estos perros presentaban esta bacteria como el principal agente bacteriano de la microbiota ótica y que ante un evento previo que desestabilizó la homeostasis microbiana, esta bacteria colonizó por completo el oído en relación a la aparición de la otitis externa. Sólo Kunder *et al.* (2015) han encontrado un alto porcentaje de identificación del *S. schleiferi* en un 96% (209/217) de sus aislados bacterianos de otitis y piodermias caninos en varias regiones de los Estados Unidos.

Por otro lado, el método de identificación para el *S. schleiferi* subsp. *coagulans* usado por Muñoz *et al* (2012) fue el BBL™ Crystal GP (Becton Dickinson®) que, si bien tiene un nivel de confianza mayor del 95% para la identificación de bacterias Gram positivas, esta prueba sigue siendo un método de diagnóstico a base de pruebas bioquímicas, comparado al sistema API. Para lograr la correcta identificación del *S. schleiferi* debe realizarse mediante pruebas moleculares y adicionarse las pruebas de coagulasa para la confirmación de la subespecie *coagulans*. Tanto el BBL™ Crystal GP como el sistema API Staph no cuentan con la prueba de coagulasa, lo cual hace dudar la veracidad de sus resultados si no son realizados de manera independiente.

En relación a las características fenotípicas del *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, halladas en el presente estudio, muestran que la fermentación de manitol ha sido comúnmente descrita como parte de la identificación del *Staphylococcus aureus*, debido a que esta bacteria fermenta fuertemente a este carbohidrato y se diferencia del *S. pseudintermedius* porque esta fermenta débilmente o en ocasiones no lo hace (Merlino *et al.* 2002). En esta investigación se encontró que de los 34 aislados de *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, 3 (8.8%) resultaron ser fuertemente fermentadoras al manitol y 10 (29.4%) fueron débilmente fermentadoras. Si bien el resultado de esta bacteria es variable, demuestra por qué existe una gran confusión al tratar de identificar bioquímicamente a las especies de *S. aureus*, *S. pseudintermedius* y *S. schleiferi* subsp. *coagulans*.

Yamashita *et al.* (2005) y Swe *et al.* (2016) mencionan las pruebas de coagulasa y ureasa como útiles para la diferenciación de las subespecies de *S. schleiferi*, pero en este estudio no se consideró la prueba de ureasa debido a que existe un porcentaje de variabilidad en cuanto a interpretación. Esto es descrito por Zdobych *et al.* (2004), donde evaluaron la confiabilidad del sistema API Staph para la identificación del *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, siendo variables los resultados en la prueba de la ureasa.

En el estudio realizado por Vandenesch *et al.* (1994) explican que la prueba de coagulasa puede ocasionar cierta confusión debido a que el EDTA presente en el plasma no es suficiente para inhibir las proteasas capaces de generar una actividad de pseudocoagulasa. Y que inclusive, estos inhibidores pueden prolongar el tiempo de aquellas cepas verdaderamente positivas, explicando porqué 14 cepas fueron negativas a la coagulasa en las primeras 4 horas pero positivas en el transcurso de las 24 horas. Por tal motivo, y siguiendo la sugerencia descrita por Swe *et al.* (2016), se optó por realizar la prueba de coagulasa en placa, para descartar esta pseudocoagulasa con el resultado negativo al factor de aglutinación.

Estudios de identificación bacteriana usando pruebas moleculares han demostrado que las subespecies del *S. schleiferi* tienen una similitud idéntica debido a que presentan los mismos polimorfismos de longitud. Esto lo demuestran los trabajos realizados por Igimi *et al.* (1990) sobre hibridación de ADN-ADN, el de Goh *et al.* (1997) sobre hibridación Checkerboard ADN-ADN, y el de Sasaki *et al.* (2010) sobre el uso del método de PCR-Múltiple para la detección del gen *nuc*, concluyendo que para la identificación de estas subespecies hace falta complementarlo con las pruebas bioquímicas, principalmente la coagulasa, determinante para la identificación de estas subespecies.

El protocolo de identificación molecular propuesto por Yamashita *et al.* (2005) sirvió de guía para esta investigación, pero fueron necesarias algunas modificaciones durante el proceso de amplificación en el termociclador debido a que ellos propusieron 25 ciclos, lo cual no fue suficiente para lograr una región lo suficientemente marcada y tuvo que aumentarse a 30 ciclos. Por otro lado, ellos realizaron la electroforesis utilizando bromuro de etidio con 2uL de producto del PCR a 100V por 20 minutos. Para este estudio se utilizó un método diferente con un buffer de carga (Safe-green), 5uL de producto de PCR y fue necesario corregir también el voltaje y tiempo, ajustándolo a 90V por 90 minutos.

Devriese *et al.* (2005) mencionan en su estudio que a diferencia del *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, el *S. pseudintermedius* produce ácido a partir de la fermentación la trehalosa, por lo cual recomienda esta prueba bioquímica para su diferenciación. Roberts *et al.* (2005) describe en su estudio, que de los 40 aislados de *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, sólo 1 resultó ser fermentador a la trehalosa, lo cual es un biotipo extraño para esta especie. Pero en esta investigación se encontró que de las 34 cepas identificadas como *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, el 41.2% (14/34) fermentaron la trehalosa, por tal motivo no es una prueba confiable para la diferenciación de estas dos especies bacterianas.

De los 34 aislados de *S. schleiferi* subsp. *coagulans* evaluados, el 38,24% (13/34) fueron sensibles a todos los antibióticos probados, un resultado casi similar al de Muñoz *et al.* (2012) donde el 54.5% de los 11 aislados fueron totalmente sensibles. Pero al mismo tiempo, ellos encontraron que un aislado fue resistente a 5 de los 9 antibióticos evaluados (amoxicilina, clindamicina, enrofloxacin, kanamicina y mupirocina). En este estudio se encontró que 9 aislados (26.5%) fueron resistentes a 3 antibióticos, 4 aislados (11,76%) fueron resistentes a 4 antibióticos, y sólo 1 (2.94%) cepa fue resistente a 6 antibióticos (gentamicina, oxacilina, cefalexina, clindamicina, ciprofloxacina y amoxicilina con ácido clavulánico).

El estudio muestra una susceptibilidad relativamente baja de 58.8% (20/34) a la ciprofloxacina, antibiótico perteneciente al grupo de las quinolonas que empíricamente es usado como primera opción para el tratamiento de otitis externas. Este resultado se asemeja a lo hallado por Kunder *et al.* (2015) donde sólo el 50% fue sensible a este antibiótico. Debido a que se han reportado casos de especies de *Staphylococcus* que poseen genes de resistencia a las quinolonas, esto podría explicar por qué de la susceptibilidad tan baja (Muñoz *et al.* 2012; Schwarz *et al.* 2018).

Otro grupo de antibióticos usados como tratamiento de primera línea para enfermedades de la piel y el oído son la cefalexina y la amoxicilina con ácido clavulánico, pero en este

estudio se encontró una sensibilidad de sólo el 61.8% (21/34) de los aislados, siendo mayor a las encontradas por Kunder *et al.* (2015) de 38.5%, pero menor a las reportadas por Penna *et al.* (2010) de 77.5% y Muñoz *et al.* (2012) donde encontraron un 100% de sensibilidad a este grupo de β lactámicos. Esto podría deberse a que el tratamiento empírico de cefalexina sólo cuando en una citología de secreción ótica se observa un gran número de bacterias cocoides, (Wiebe 2015).

Los aminoglucósidos han sido descritos como antibióticos que deben usarse para casos de bacterias multirresistentes, y su uso está restringido para el tratamiento de otitis externas debido a que son ototóxicos. Sorprendentemente, un 26.5% (9/34) de las cepas fueron resistentes a la gentamicina, siendo este valor menor a lo hallado en los estudios de Kunder *et al.* (2015) y Penna *et al.* (2010), donde encontraron una resistencia a la gentamicina en un 47% y 62.5%, respectivamente. Mientras que para el caso de la neomicina, se encontró una resistencia de sólo un 8.8% (3/34), con gran diferencia a lo hallado por Penna *et al.* (2010) donde tuvieron una resistencia del 87.5% a este antibiótico.

La resistencia a la clindamicina hallada en este estudio fue sólo del 11.8%, lo cual es menor a lo hallado por Kunder *et al.* (2015) y Muñoz *et al.* (2012), donde hallaron una resistencia del 22% y 27%, respectivamente.

La nitrofurantoína fue el antibiótico que mejor sensibilidad demostró en este estudio con un 97.1% (33/34), pero en el estudio de Penna *et al.* (2010) tan sólo encontró una sensibilidad en un 50% de los 14 casos evaluados.

Las cepas que fenotípicamente presentan resistencia a la oxacilina, reciben la denominación de *Staphylococcus* Resistente a la Meticilina, siendo la especie más conocida el *S. aureus* (SARM). Los SARM son de gran importancia en salud pública debido a que son

causantes de la mayoría de infecciones nosocomiales en medicina humana (Sakoulas *et al.* 2001). Este estudio demostró que existe una resistencia a la oxacilina en el 38,2% (13/34) de los aislados evaluados, siendo casi idéntico al mostrado por Cain *et al.* (2011) donde encontraron una resistencia del 39% (20/51) de aislados de *S. schleiferi* coagulasa positiva. Estos porcentajes son menores a los encontrados por Kunder *et al.* (2015), donde evaluaron la resistencia del *S. schleiferi* aislado de perros en 2 regiones de Estados Unidos, encontrando valores del 62% (72/116) y 73% (74/101) de cepas resistentes a la meticilina.

Kunder *et al.* (2015) describe además que la exposición a las infecciones recurrentes y tratamientos antibióticos constantes favorecen la colonización de *Staphylococcus* meticilino resistentes. Las consecuencias de esto se ve reflejado en no sólo su resistencia las penicilinas (penicilina, amoxicilina, ampicilina) y cefalosporinas de primera y segunda generación (cefalexina, cefalotina, cefazolina), sino que además puede estar relacionada con la resistencia a macrólidos, aminoglucósidos, tetraciclinas y fluoroquinolonas (Morris *et al.* 2006; Kawakami *et al.* 2010). Teniendo en cuenta la relación que existe de los dueños con las mascotas, muchas de estas bacterias resistentes podrían determinar un riesgo de zoonosis o zoonosis inversa (Frank *et al.* 2009).

VI. CONCLUSIONES

1. Es el primer reporte de hallazgo del *Staphylococcus schleiferi* subespecie *coagulans* mediante pruebas moleculares y bioquímicas que se realiza en nuestro país.
2. El 75,68% (112/148) de las otitis externas en caninos de la CAME FMV UNMSM están asociadas al género *Staphylococcus*. Determinándose *Staphylococcus schleiferi* subespecie *coagulans* en un 30,36% (34/112)
3. El 38,2% (13/34) de los *Staphylococcus schleiferi* subespecie *coagulans* fueron resistente a la meticilina.

VII. RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar pruebas de identificación exacta a todas las especies de *Staphylococcus* sp. aislados de infecciones en personas y animales. Esto permitirá conocer las variaciones fenotípicas y genotípicas que han adquirido y, por consiguiente, realizar estudios epidemiológicos de las enfermedades relacionadas al *Staphylococcus* sp. y su susceptibilidad antimicrobiana.

Habiéndose detectado al *Staphylococcus schleiferi* subespecie *coagulans* en este estudio, se recomienda usar estos aislados en futuros estudios para conocer el genoma completo y observar todos los genes de resistencia que poseen. Así mismo, buscar alguna característica genética que sea específica de esta subespecie que ayude con su identificación precisa y rápida usando sólo pruebas moleculares.

Habiendo reportes de casos donde detectaron al *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* en infecciones intrahospitalarias, relacionadas a trasplantes o enfermedades cardíacas en personas, se recomienda evaluar todas aquellas infecciones adquiridas en actos quirúrgicos que pudieran estar relacionadas a un *Staphylococcus* coagulasa positivo, más aún si conviven con perros que tengan o hayan tenido otitis externa.

VIII. LITERATURA CITADA

1. Amako K, Umeda A. 1977. Scanning Electron Microscopy of Staphylococcus Sequence of Cell Division Revealed on the Cells Cultured on Solid Medium. J Ultrastruct Res. 58:34–40.
2. Bajwa J. 2019. Canine otitis externa - Treatment and complications. Can Vet J. 60(1):97–99.
3. Bemis DA, Jones RD, Hiatt LE, Ofori ED, Rohrbach BW, Frank LA, Kania SA. 2006. Comparison of tests to detect oxacillin resistance in Staphylococcus intermedius, Staphylococcus schleiferi, and Staphylococcus aureus isolates from canine hosts. J Clin Microbiol. 44(9):3374–3376. doi:10.1128/JCM.01336-06.
4. Bradley S. 2015. Staphylococcus. In: Clinical Infectious Disease. Segunda ed. Cambridge University Press. p. 985–990.
5. Bugden DL. 2013. Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from dogs with otitis externa in Australia. Aust Vet J. 91(1–2):43–46. doi:10.1111/avj.12007.
6. Cain CL, Morris DO, O'Shea K, Rankin SC. 2011. Genotypic relatedness and phenotypic characterization of Staphylococcus schleiferi subspecies in clinical samples from dogs. Am J Vet Res. 72(1):96–102. doi:10.2460/ajvr.72.1.96.
7. Choi N, Edginton HD, Griffin CE, Angus JC. 2018. Comparison of two ear cytological collection techniques in dogs with otitis externa. Vet Dermatol. 29(5):413-e136. doi:10.1111/vde.12664.
8. Coatesworth J. 2011. Causes of otitis externa in the dog. Companion Anim. 16(6):35–

38. doi:10.1111/j.2044-3862.2011.00085.x.
9. Craig M. 2013. Disease Facts : otitis externa. *Companion Anim.* 18(10):481–483.
10. Davis MF, Cain CL, Brazil AM, Rankin SC. 2013. Two coagulase-negative staphylococci emerging as potential zoonotic pathogens: Wolves in sheep's clothing? *Front Microbiol.* 4(123):1–4. doi:10.3389/fmicb.2013.00123.
11. Devriese LA, Vancanneyt M, Baele M, Vaneechoutte M, De Graef E, Snauwaert C, Cleenwerck I, Dawyndt P, Swings J, Decostere A, et al. 2005. *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. *Int J Syst Evol Microbiol.* 55(4):1569–1573. doi:10.1099/ijs.0.63413-0.
12. Frank LA, Kania SA, Hnilica KA, Wilkes RP, Bemis DA. 2003. Isolation of *Staphylococcus schleiferi* from dogs with pyoderma. *J Am Vet Med Assoc.* 222(4):451–454. doi:10.2460/javma.2003.222.451.
13. Frank LA, Kania SA, Kirzeder EM, Eberlein LC, Bemis DA. 2009. Risk of colonization or gene transfer to owners of dogs with methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *Vet Dermatol.* 20(5–6):496–501. doi:10.1111/j.1365-3164.2009.00826.x.
14. Freney J, Brun Y, Bes M, Meugnier H, Grimont F, Grimont PAD, Nerv1 C, Fleurette ' J. 1988. Two Species from Human Clinical Specimens. *Int J Syst Bacteriol.* 38(2):168–172.
15. Goh SH, Santucci Z, Kloos WE, Faltyn M, George CG, Driedger D, Hemmingsen SM. 1997. Identification of *Staphylococcus* species and subspecies by the chaperonin 60 gene identification method and reverse checkerboard hybridization. *J Clin Microbiol.* 35(12):3116–3121.
16. Griffeth GC, Morris DO, Abraham JL, Shofer FS, Rankin SC. 2008. Screening for skin carriage of methicillin-resistant coagulase-positive staphylococci and *Staphylococcus schleiferi* in dogs with healthy and inflamed skin. *Vet Dermatol.* 19(3):142–149. doi:10.1111/j.1365-3164.2008.00663.x.
17. Hubálek Z. 2003. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology.* 46(3):205–229. doi:10.1016/S0011-2240(03)00046-4.
18. Igimi S, Takahashi E, Mitsuoka T. 1990. *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* subsp. nov., Isolated from the External Auditory Meatus of Dogs with External Ear

- Otitis. *Int J Syst Bacteriol.* 40(4):409–411.
19. Igimi S, Takahashi E, Mitsuola T. 2009. *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* subsp. nov., Isolated from the External Auditory Meatus of Dogs with External Ear Otitis. *Int J Syst Bacteriol.* 40(4):409–411. doi:10.1099/00207713-40-4-409.
 20. Johansson K-E, Bergfeldt A, Fernström L-L, Hansson I, Jansson D, Lewerin SS, Tamm S, Trowald-Wigh G. 2014. VetBact – culturing bacteriological knowledge for veterinarians. *Vet Rec.* 174(7):162–164. doi:10.1136/vr.g162.
 21. K. Hermans , L. A. Devriese and FH. 2010. *Staphylococcus*. In: C. L. Gyles, J. F. Prescott JGS and COT, editor. *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*. Fourth Edi. Blackwell Publishing. p. 75–89.
 22. Kania SA, Williamson NL, Frank LA, Wilkes RP, Jones RD, Bemis DA. 2004. Methicillin resistance of staphylococci isolated from the skin of dogs with pyoderma. *Am J Vet Res.* 65(9):1265–1268. doi:10.2460/ajvr.2004.65.1265.
 23. Kawakami T, Shibata S, Murayama N, Nagata M, Nishifuji K. 2010. Antimicrobial Susceptibility and Methicillin Resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* and *Staphylococcus schleiferi* subsp . *coagulans* Isolated from Dogs with Pyoderma in Japan. *J Vet Med Sci.* 72(12):1615–1619.
 24. Korbelik J, Singh A, Rousseau J, Weese JS. 2019. Characterization of the otic bacterial microbiota in dogs with otitis externa compared to healthy individuals. *Vet Dermatol.*:1–10. doi:10.1111/vde.12734.
 25. Kosecka-Strojek M, Sabat AJ, Akkerboom V, Becker K, van Zanten E, Wisselink G, Miedzobrodzki J, Kooistra-Smid AMD, Friedrich AW. 2019. Development and Validation of a Reference Data Set for Assigning *Staphylococcus* Species Based on Next-Generation Sequencing of the 16S-23S rRNA Region. *Front Cell Infect Microbiol.* 9(August):1–19. doi:10.3389/fcimb.2019.00278.
 26. Kumar D, Cawley JJ, Alvarez A, Alvarez S. 2007. Case of *Staphylococcus schleiferi* subspecies *coagulans* endocarditis and metastatic infection in an immune compromised host. *Transpl Infect Dis.* 9:336–338. doi:10.1111/j.1399-3062.2007.00222.x.
 27. Kunder DA, Cain CL, O’Shea K, Cole SD, Rankin SC. 2015. Genotypic relatedness and antimicrobial resistance of *Staphylococcus schleiferi* in clinical samples from

- dogs in different geographic regions of the United States. *Vet Dermatol.* 26(6):406–411. doi:10.1111/vde.12254.
28. Leung MJ, Nuttall N, Mazur M, Taddei TL, McComish M, Pearman JW. 1999. Case of *Staphylococcus schleiferi* endocarditis and a simple scheme to identify clumping factor-positive staphylococci. *J Clin Microbiol.* 37(10):3353–3356.
 29. Logas D. 2013. Feline and Canine Otitis Media. In: Monnet E, editor. *Small Animal Soft Tissue Surgery*. First Edit. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. p. 121–125.
 30. Merlino J, Watson J, Barbara R, Beard-Pegler M, Gottlieb T, Bradbury R, Harbour C. 2002. Detection and expression of methicillin/oxacillin resistance in multidrug-resistant and non-multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* in Central Sydney, Australia. *J Antimicrob Chemother.* 49(5):793–801. doi:10.1093/jac/dkf021.
 31. Molinos Abós S, Giménez Pérez M. 2005. Características clínico-microbiológicas de las infecciones por *Staphylococcus schleiferi* y otros estafilococos coagulasa-negativos. *Control Calid SEIMC.*:1–4.
 32. Morris DO, Rook KA, Shofer FS, Rankin SC. 2006. Screening of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, and *Staphylococcus schleiferi* isolates obtained from small companion animals for antimicrobial resistance: A retrospective review of 749 isolates (2003-04). *Eur Soc Vet Dermatology.* 17(5):332–337. doi:10.1111/j.1365-3164.2006.00536.x.
 33. Muñoz L, Molina M, Heresmann M, Abusleme F, Ulloa M, Borie C, San Martin B, Silva V, Anticevic S. 2012. Primer reporte de aislamiento de *Staphylococcus schleiferi* subespecie *coagulans* en perros con pioderma y otitis externa en Chile. *Arch Med Vet.* 44(3):261–265. doi:10.4067/S0301-732X2012000300008.
 34. Newman AW, Estey CM, McDonough S, Cerda-Gonzalez S, Larsen M, Stokol T. 2015. Cholesteatoma and meningoencephalitis in a dog with chronic otitis externa. *Vet Clin Pathol.* 44(1):157–163. doi:10.1111/vcp.12212.
 35. Ngo J, Taminiau B, Fall PA, Daube G, Fontaine J. 2018. Ear canal microbiota – a comparison between healthy dogs and atopic dogs without clinical signs of otitis externa. *Vet Dermatol.* 29(5):425-e140. doi:10.1111/vde.12674.
 36. Nuttall T, Cole LK. 2004. Ear cleaning: The UK and US perspective. *Vet Dermatol.* 15(2):127–136. doi:10.1111/j.1365-3164.2004.00375.x.

37. Penna B, Vargas R, Medeiros L, Martins GM, Martins RR, Lilenbaum W. 2010. Species distribution and antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from canine otitis externa. *Vet Dermatol.* 21(3):292–296. doi:10.1111/j.1365-3164.2009.00842.x.
38. Quin P, Markey B, Leonard F, FitzPatrick E, Fanning S, Hartigan P. 2011. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. 2nd Editio. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd.
39. Rhodes KH, Werner AH. 2018. Otitis Externa, Media, and Interna. In: Blackwell's Five-Minute Veterinary Consult Clinical Companion: Small Animal Dermatology. 3rd editio. Iowa: John Wiley & Sons, Inc. p. 541–562.
40. Roberts S, Shea KO, Morris D, Robb A, Morrison D, Rankin S. 2005. A real-time PCR assay to detect the Pantón Valentine Leukocidin toxin in staphylococci: screening *Staphylococcus schleiferi* subspecies *coagulans* strains from companion animals. *Vet Microbiol.* 107:139–144. doi:10.1016/j.vetmic.2005.01.002.
41. Rodicio M, Mendoza M. 2004. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecc Microbiol Clínica.* 22(4):238–245.
42. Sacaquíspe Contreras RE, Velásquez Pomar J. 2002. *Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión*. Lima: Ministerio de Salud.
43. Sakoulas G, Gold HS, Venkataraman L, Degirolami PC, Eliopoulos GM, Qian Q. 2001. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Comparison of susceptibility testing methods and analysis of *mecA*-positive susceptible strains. *J Clin Microbiol.* 39(11):3946–3951. doi:10.1128/JCM.39.11.3946-3951.2001.
44. Sasaki T, Tsubakishita S, Tanaka Y, Sakusabe A, Ohtsuka M, Hirotaki S, Kawakami T, Fukata T, Hiramatsu K. 2010. Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive staphylococci. *J Clin Microbiol.* 48(3):765–769. doi:10.1128/JCM.01232-09.
45. Schleifer K-H, Bell JA. 2015. *Staphylococcus*. *Bergey's Man Syst Archaea Bact.*:1–43. doi:10.1002/9781118960608.gbm00569.
46. Schwarz S, Feßler AT, Loncaric I, Wu C, Kadlec K, Wang Y, Shen J. 2018.

- Antimicrobial Resistance among Staphylococci of Animal Origin. *Microbiol Spectr.* 6(4):1–29. doi:10.1128/microbiolspec.arba-0010-2017.
47. Swe T, Naing AT, Baqui A, Khillan R. 2016. Methicillin-resistant *Staphylococcus schleiferi* subspecies *coagulans* infection in a patient with hepatocellular carcinoma. *J Investig Med High Impact Case Reports.* 4(3):1–3. doi:10.1177/2324709616671148.
 48. Thibodeau E, Boucher H, DeNofrio D, Pham DT, Snyderman D. 2012. First report of a left ventricular assist device infection caused by *Staphylococcus schleiferi* subspecies *coagulans*: A coagulase-positive organism. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 74(1):68–69. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2012.05.027.
 49. Vandenesch F, Lebeau C, Bes M, Lina G, Lina B, Greenland T, Benito Y, Brun Y, Fleurette J, Etienne J. 1994. Clotting activity in *Staphylococcus schleiferi* subspecies from human patients. *J Clin Microbiol.* 32(2):388–392.
 50. Wiebe VJ. 2015. *Drug Therapy for Infectious Diseases of the Dog and Cat.* Iowa: John Wiley & Sons, Inc.
 51. Wisner ER, Zwingenberger AL. 2015. Ear. In: *Atlas of Small Animal CT and MRI.* 1ra Edición. John Wiley & Sons, Inc. p. 27–39.
 52. Yamashita K, Shimizu A, Kawano J, Uchida E, Haruna A, Igimi S. 2005. Isolation and characterization of staphylococci from external auditory meatus of dogs with or without otitis externa with special reference to *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* isolates. *J Vet Med Sci.* 67(3):263–8. doi:10.1292/jvms.67.263.
 53. Zdovc I, Ocepek M, Pirš T, Krt B, Pinter L. 2004. Microbiological features of *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans*, isolated from dogs and possible misidentification with other canine coagulase-positive staphylococci. *J Vet Med Ser B Infect Dis Vet Public Heal.* 51(10):449–454. doi:10.1111/j.1439-0450.2004.00792.x.
 54. Zur G, Gurevich B, Elad D. 2016. Prior antimicrobial use as a risk factor for resistance in selected *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from the skin and ears of dogs. *Vet Dermatol.* 27(6):468–e125. doi:10.1111/vde.12382.
 55. Zur G, Lifshitz B, Bdolah-Abram T. 2011. The association between the signalment, common causes of canine otitis externa and pathogens. *J Small Anim Pract.*

52(5):254–258. doi:10.1111/j.1748-5827.2011.01058.x.

IX. APÉNDICE

Cuadro A1: Identificación de los aislados de *Staphylococcus* sp.

CÓDIGO	FECHA DE RECEPCIÓN	DATOS DEL PACIENTE			
		PROCEDENCIA	RAZA	SEXO	EDAD
S001	3/01/2018	ATE VITARTE	SHIH TZU	HEMBRA	16 AÑOS
S002	3/01/2018	ATE VITARTE	SHIH TZU	HEMBRA	16 AÑOS
S003	8/01/2018	CERCADO LIMA	MESTIZO	HEMBRA	13 AÑOS
S004	8/01/2018	CERCADO LIMA	MESTIZO	HEMBRA	13 AÑOS
S005	9/01/2018	LA MOLINA	MESTIZO	MACHO	2.2 AÑOS
S006	10/01/2018	ATE VITARTE	SHIH TZU	MACHO	7 AÑOS
S007	10/01/2018	SAN LUIS	MESTIZO	HEMBRA	1 AÑO
S008	10/01/2018	SAN LUIS	MESTIZO	HEMBRA	1 AÑO
S009	10/01/2018	LOS OLIVOS	MESTIZO	HEMBRA	2 AÑOS
S010	11/01/2018	SURCO	COCKER SPANIEL	MACHO	4.5 AÑOS
S011	11/01/2018	SURCO	COCKER SPANIEL	MACHO	4.5 AÑOS
S012	15/01/2018	SAN LUIS	BEAGLE	MACHO	1.5 AÑOS
S013	15/01/2018	SAN LUIS	BEAGLE	MACHO	1.5 AÑOS
S014	15/01/2018	EL AGUSTINO	MESTIZO	MACHO	17 AÑOS
S015	15/01/2018	EL AGUSTINO	MESTIZO	MACHO	17 AÑOS
S016	18/01/2018	SMP	SIBERIAN HUSKY	HEMBRA	3 AÑOS
S017	23/01/2018	SURCO	GOLDEN RETRIEVER	HEMBRA	2 AÑOS
S018	23/01/2018	JESÚS MARÍA	MESTIZO	MACHO	5.3 AÑOS
S019	23/01/2018	JESÚS MARÍA	MESTIZO	MACHO	5.3 AÑOS
S020	23/01/2018	CHORRILLOS	SHIH TZU	HEMBRA	7 AÑOS
S021	25/01/2018	SURCO	MESTIZO	MACHO	5 AÑOS
S022	26/01/2018	ATE VITARTE	SHAR-PEI	MACHO	1 AÑO
S023	26/01/2018	ATE VITARTE	SHAR-PEI	MACHO	1 AÑO
S024	28/01/2018	CHACLACAYO	WESTY	HEMBRA	1.5 AÑOS
S025	28/01/2018	CHACLACAYO	WESTY	HEMBRA	1.5 AÑOS
S026	30/01/2018	SAN BORJA	SIBERIAN HUSKY	HEMBRA	10 AÑOS
S027	30/01/2018	SAN BORJA	SIBERIAN HUSKY	HEMBRA	10 AÑOS
S028	5/02/2018	ATE VITARTE	JACK RUSSELL	MACHO	6 AÑOS
S029	5/02/2018	ATE VITARTE	JACK RUSSELL	MACHO	6 AÑOS
S030	5/02/2018	LA VICTORIA	PEKINÉS	HEMBRA	8 AÑOS
S031	6/02/2018	RIMAC	ROTTWEILER	MACHO	12 AÑOS

S032	6/02/2018	VILLA EL SALVADOR	MESTIZO	MACHO	6 AÑOS
S033	5/02/2018	SAN BORJA	PUG	MACHO	2 AÑOS
S034	7/02/2018	CHORRILLOS	MESTIZO	HEMBRA	8 AÑOS
S035	8/02/2018	SURCO	YORKSHIRE TERRIER	MACHO	7 AÑOS
S036	9/02/2018	SAN LUIS	YORKSHIRE TERRIER	HEMBRA	5 AÑOS
S037	13/02/2018	MIRAFLORES	GOLDEN RETRIEVER	MACHO	13 AÑOS
S038	13/02/2018	MIRAFLORES	GOLDEN RETRIEVER	MACHO	13 AÑOS
S039	15/02/2018	SAN BORJA	MESTIZO	HEMBRA	1.8 AÑOS
S040	15/02/2018	SAN BORJA	MESTIZO	HEMBRA	1.8 AÑOS
S041	20/02/2018	SURCO	GOLDEN RETRIEVER	HEMBRA	8 AÑOS
S042	20/02/2018	SURCO	GOLDEN RETRIEVER	HEMBRA	8 AÑOS
S043	7/03/2018	ATE VITARTE	PUG	HEMBRA	2.5 AÑOS
S044	7/03/2018	ATE VITARTE	PUG	HEMBRA	2.5 AÑOS
S045	8/03/2018	SAN MIGUEL	MESTIZO	MACHO	9 AÑOS
S046	8/03/2018	SAN MIGUEL	MESTIZO	MACHO	9 AÑOS
S047	8/03/2018	SAN LUIS	SCHNAUZER	MACHO	-
S048	8/03/2018	LA MOLINA	MESTIZO	HEMBRA	7 AÑOS
S049	8/03/2018	LA MOLINA	MESTIZO	HEMBRA	7 AÑOS
S050	13/03/2018	SAN BARTOLO	BULLDOG INGLÉS	MACHO	1.5 AÑOS
S051	13/03/2018	SAN BARTOLO	BULLDOG INGLÉS	MACHO	1.5 AÑOS
S052	13/03/2018	LINCE	MESTIZO	MACHO	10.5 AÑOS
S053	22/03/2018	SURCO	LABRADOR RETRIEVER	HEMBRA	1.5 AÑOS
S054	22/03/2018	SURCO	LABRADOR RETRIEVER	HEMBRA	1.5 AÑOS
S055	26/03/2018	SAN ISIDRO	PASTOR ALEMAN	HEMBRA	6 AÑOS
S056	26/03/2018	SAN ISIDRO	PASTOR ALEMAN	HEMBRA	6 AÑOS
S057	26/03/2018	SAN LUIS	SCHNAUZER	MACHO	8 AÑOS
S058	26/03/2018	SAN LUIS	SCHNAUZER	MACHO	8 AÑOS
S059	26/03/2018	LA MOLINA	MESTIZO	HEMBRA	13 AÑOS
S060	26/03/2018	LA MOLINA	MESTIZO	HEMBRA	13 AÑOS
S061	27/03/2018	SAN BORJA	BEAGLE	MACHO	7 AÑOS

S062	27/03/2018	SAN BORJA	BEAGLE	MACHO	7 AÑOS
S063	28/03/2018	SURCO	GOLDEN RETRIEVER	MACHO	6 AÑOS
S064	28/03/2018	SURCO	GOLDEN RETRIEVER	MACHO	6 AÑOS
S066	2/04/2018	LA MOLINA	MESTIZO	MACHO	6 AÑOS
S067	3/04/2018	ATE VITARTE	BEAGLE	HEMBRA	5 AÑOS
S068	3/04/2018	ATE VITARTE	BEAGLE	HEMBRA	5 AÑOS
S069	9/04/2018	SANTA ANITA	MESTIZO	HEMBRA	7 AÑOS
S070	9/04/2018	SANTA ANITA	MESTIZO	HEMBRA	7 AÑOS
S071	10/04/2018	SAN BORJA	MESTIZO	MACHO	4 AÑOS
S072	10/04/2018	SAN BORJA	MESTIZO	MACHO	4 AÑOS
S073	10/04/2018	SAN BORJA	MESTIZO	MACHO	4 AÑOS
S074	23/04/2018	LA VICTORIA	BEAGLE	MACHO	5 AÑOS
S075	23/04/2018	LA VICTORIA	BEAGLE	MACHO	5 AÑOS
S076	24/04/2018	LA MOLINA	AIREDALE TERRIER	HEMBRA	2.7 AÑOS
S077	24/04/2018	LA MOLINA	AIREDALE TERRIER	HEMBRA	2.7 AÑOS
S078	24/04/2018	BARRACO	PUG	HEMBRA	3 AÑOS
S079	24/04/2018	BARRACO	PUG	HEMBRA	3 AÑOS
S080	25/04/2018	SURCO	MESTIZO	MACHO	8 AÑOS
S081	25/04/2018	SURCO	MESTIZO	MACHO	8 AÑOS
S082	5/05/2018	SAN LUIS	PSPP	MACHO	6 AÑOS
S083	5/05/2018	SAN LUIS	PSPP	MACHO	6 AÑOS
S084	26/04/2018	SAN BORJA	BULLDOG INGLÉS	MACHO	6 AÑOS
S085	9/04/2018	SURCO	COCKER SPANIEL	MACHO	12 AÑOS
S086	9/04/2018	SURCO	COCKER SPANIEL	MACHO	12 AÑOS
S087	10/04/2018	SAN BORJA	SCHNAUZER	MACHO	7 AÑOS
S088	10/04/2018	SAN BORJA	SCHNAUZER	MACHO	7 AÑOS
S089	16/05/2018	SURQUILLO	BULLDOG FRANCÉS	MACHO	8 MESES
S090	16/05/2018	SURQUILLO	BULLDOG FRANCÉS	MACHO	8 MESES
S091	22/05/2018	CHORRILLOS	SCHNAUZER	MACHO	5 AÑOS
S092	22/05/2018	CHORRILLOS	SCHNAUZER	MACHO	5 AÑOS
S093	23/05/2018	LOS OLIVOS	BEAGLE	MACHO	6 MESES
S094	29/05/2018	SAN BORJA	LABRADOR RETRIEVER	MACHO	9 AÑOS
S095	29/05/2018	SAN BORJA	LABRADOR RETRIEVER	MACHO	9 AÑOS

S096	29/05/2018	SURCO	BICHÓN MALTÉS	MACHO	12 AÑOS
S097	4/06/2018	LA MOLINA	LABRADOR RETRIEVER	MACHO	7 AÑOS
S098	4/06/2018	LA MOLINA	LABRADOR RETRIEVER	MACHO	7 AÑOS
S099	6/06/2018	SAN BORJA	SCHNAUZER	MACHO	12 AÑOS
S100	6/06/2018	SAN BORJA	SCHNAUZER	MACHO	12 AÑOS
S101	11/06/2018	SURCO	LABRADOR RETRIEVER	MACHO	11 AÑOS
S102	11/06/2018	LA MOLINA	SCOTTISH TERRIER	MACHO	5 ÑOS
S103	12/06/2018	SAN BORJA	GOLDEN RETRIEVER	HEMBRA	5 AÑOS
S104	12/06/2018	SAN BORJA	GOLDEN RETRIEVER	HEMBRA	5 AÑOS
S105	15/06/2018	SAN ISIDRO	MESTIZO	HEMBRA	2.3 AÑOS
S106	18/06/2018	SURQUILLO	SHAR-PEI	HEMBRA	4 AÑOS
S107	20/06/2018	SURCO	MESTIZO	MACHO	6 AÑOS
S108	20/06/2018	SURCO	MESTIZO	MACHO	6 AÑOS
S109	21/06/2018	LA MOLINA	GOLDEN RETRIEVER	MACHO	7 MESES
S110	23/06/2018	ATE VITARTE	BICHÓN MALTÉS	HEMBRA	5 AÑOS
S111	25/06/2018	ATE VITARTE	BICHÓN MALTÉS	HEMBRA	5 AÑOS
S112	25/06/2018	LA MOLINA	SIBERIAN HUSKY	HEMBRA	11 AÑOS
S113	27/06/2018	SAN BORJA	MESTIZO	HEMBRA	8 AÑOS
S114	27/06/2018	SAN BORTA	MESTIZO	HEMBRA	8 AÑOS
S115	27/06/2018	ATE VITARTE	SCHNAUZER	MACHO	2.5 AÑOS
S116	27/06/2018	ATE VITARTE	SCHNAUZER	MACHO	2.5 AÑOS
S117	29/06/2018	LA MOLINA	COCKER SPANIEL	MACHO	5 AÑOS

Cuadro A2. Protocolo de Purificación de ADN genómico para bacterias Gram positivas

Paso	Procedimiento
1	Incubar la bacteria hasta lograr una concentración de 2×10^9 en un tubo de microcentrífuga de 1.5 o 2mL y centrifugar por 10 minutos a $5000 \times g$. Descartar el sobrenadante.
2	Resuspender el producto en 180 μ L de búfer de lisis para bacterias Gram positivas. Incubar por 30 minutos a 37°C .
3	Agregar 200 μ L de solución de lisis y 20 μ L de Proteinasa K. Mezclar fuertemente en un agitador vórtex hasta obtener una muestra uniforme.
4	Incubar la muestra a 56°C por al menos 30 minutos. Colocar ocasionalmente en el agitar vórtex.
5	Agregar 15 μ L de la solución de ARNasa, mezclar en el agitador vórtex e incubar por 10 minutos a temperatura ambiente.
6	Agregar 400 μ L de etanol al 50% y mezclar en el agitador vórtex.
7	Transferir el preparado lisado a una columna de purificación insertado en un tubo de colección. Centrifugar la columna por 1 minuto a $6000 \times g$. Descartar el contenido del tubo de colección. Traspasar la columna de purificación a un nuevo tubo de colección.
8	Agregar 500 μ L de búfer de lavado I (con etanol agregado) a la columna de purificación. Centrifugar por 1 minuto a $8000 \times g$. Descartar el contenido del tubo de colección y recolocar la columna de purificación en el mismo tubo de colección.
9	Agregar 500 μ L de búfer de lavado II (con etanol agregado) a la columna de purificación. Centrifugar por 3 minutos a velocidad máxima (mayor a $12000 \times g$). Opcional: De observarse restos en la columna de purificación, se puede volver a centrifugar por 1 minuto a la misma velocidad. Descartar el contenido del tubo de colección y traspasar la columna de purificación a un tubo de microcentrífuga estéril de 1.5mL.
10	Agregar 100 μ L de búfer de elución en el centro de la membrana de la columna de purificación para eluir el ADN genómico. Incubar por 2 minutos a temperatura ambiente y centrifugar por 1 minuto a $8000 \times g$.
11	Descartar la columna de purificación. Usar el producto de la extracción inmediatamente o almacenar a -20°C .